

Institut für Biochemie der Charité'

DISSERTATION

**Strukturelle und biochemische Analyse der  
20S Proteasom-Subtypen aus humanen  
Zellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctorum rerum naturalium

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

Dipl.-Biochemikerin Nicola Klare

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Dahlmann  
2. Prof. Dr. P.-M. Kloetzel  
3. Prof. Dr. W. Lockau

eingereicht: 27.10.2004

Datum der Promotion: 15.02.2005

**gewidmet meinen Kindern Saskia und Amelie**

## **Abstract**

Das Ubiquitin-Proteasom-System sorgt in eukaryontischen Zellen für einen kontrollierten Abbau von Proteinen. Das 20S Proteasom ist als Multikatalytischer Protease Komplex der zentrale Bestandteil dieses Systems. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich gereinigtes 20S Proteasom aus HeLa-Zellen chromatographisch in Subtypen auftrennen lässt, die sich strukturell und in ihrer proteolytischen Aktivität unterscheiden. Nach Induktion der Zellen mit gamma-Interferon (gamma-IFN) werden Immuno-Proteasomen gebildet und es kommt zu einer Veränderung des Subtypen-Musters und der Aktivitäten. Unter dem Einfluss von gamma-IFN bilden sich hauptsächlich Mischkomplexe mit sowohl konstitutiven als auch Immuno-Untereinheiten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in den Zellkompartimenten Cytoplasma, Zellkern und Microsomen von HeLaS3-Zellen unterschiedliche 20S Proteasom-Subtypen vorkommen. Dies war unter anderem auf eine unterschiedliche Glykosylierung einzelner proteasomaler Untereinheiten zurückzuführen. Die genaue Kenntnis von Struktur und Funktion der 20S Proteasom-Subtypen ist im Hinblick auf neue diagnostische und therapeutische Ansätze in der Humanmedizin von großem Interesse.

Schlüsselworte: 20S Proteasom, Subtypen, Glykosylierung, HeLa, gamma-Interferon

## **Abstract**

The Ubiquitin-proteasome system is responsible for the regulated protein degradation in eucaryotic cells. The 20S proteasome is as a multicatalytic protease the central complex of these system. This study has shown that it is possible to separate 20S proteasome subtypes from HeLa cells by chromatography. 20s proteasome subtypes differ in structure and proteolytic activity. The subtype-pattern and the activity are significantly changed after an induction of the cells with gamma-Interferon (gamma-IFN) under formation of immuno proteasomes. After gamma-IFN induction mainly mixed complexes have been formed with both constitutive and immuno subunits. Further it has been shown that in cell compartements cytoplasm, microsomes and nucleus of HeLaS3 cells different 20S proteasome subtypes are located. Among other things glycosylation of some subunits is responsible for that phenomenon. With regard to new strategies in diagnostic and therapy of human diseases the exactly knowledge of structure and function of the proteasome subtypes is a case of interest.

Keywords: 20S proteasome, subtypes, glycosylation, HeLa, gamma-IFN

Zusammenfassung	8
1	Einleitung 9
1.1	Proteinmetabolismus als wichtiges regulatorisches Prinzip 9
1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System 9
1.3	Das 20S Proteasom 10
1.4	Die Regulatorkomplexe und das 26S Proteasom 11
1.5	Assemblierung des 20S Proteasoms 13
1.6	Das Immuno-Proteasom 14
1.7	Subzelluläre Lokalisation des Proteasoms 16
1.8	Subpopulationen des Proteasoms 16
1.9	Ziel der vorliegenden Arbeit 17
2	Material und Methoden 18
2.1	Material 18
2.1.1	Geräte 18
2.1.2	Chromatographie-Materialien und Fertigsäulen 19
2.1.3	Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien 19
2.1.4	Antikörper 20
2.1.5	Enzyme und Lectine 20
2.2	Methoden 21
2.2.1	Zellkultur 21
2.2.1.1	Zelllinien 21
2.2.1.2	Kultur von adherenten Zellen: 21
2.2.1.3	Kultur von Suspensionszellen: 21
2.2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen 21
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden 22
2.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration 22
2.2.2.2	TCA Präzipitation 22
2.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen 22
2.2.2.4	2D-Gelelektrophorese Non-Equilibrium-pH-Gradient-Elektrophorese (NEpHGE) 22
2.2.2.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen 22
2.2.2.6	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen 23
2.2.2.7	Immunpräzipitation 23
2.2.2.8	Westernblot und Immunodetektion 23
2.2.2.9	ECL Detektion 24
2.2.3	Isolierung von 20S Proteasomen aus HeLa- bzw. HeLa S3-Zellen 24
2.2.3.1	Differentielle Zentrifugation 24
2.2.3.2	Isolation von 20S Proteasom aus Cytoplasma 24
2.2.3.2.1	Anionenaustausch-Chromatographie 24
2.2.3.2.2	Ammoniumsulfatfällung 25
2.2.3.2.3	Gelfiltration 25
2.2.3.2.4	FPLC - Anionenaustausch-Chromatographie 25
2.2.3.2.5	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenylsepharose 25

2.2.3.3	Isolation von 20S Proteasom aus Zellkernen	26
2.2.3.4	Isolation von 20S Proteasom aus Microsomen	26
2.2.4	Isolation von 20S Proteasomen mittels Affinitäts -Chromatographie	26
2.2.5	Analytik der gereinigten 20S Proteasomen	27
2.2.5.1	Trennung der Proteasomen-Subtypen	27
2.2.5.2	Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit fluorogenen Substraten	27
2.2.5.3	Verdau der 20S Proteasomen mit Glykosidasen	28
2.2.5.4	Lectindetektion	28
2.2.5.5	Kohlenhydrat-Analytik	29
2.2.5.5.1	Monosaccharidanalyse	29
2.2.5.5.2	Neuraminsäure-Analyse	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Einzelzellen enthalten mehrere 20S Proteasom-Subtypen	30
3.1.1	20S Proteasom-Subtypen aus T2- und T2/LMP2+7-Zellen	30
3.1.2	20S Proteasom-Subtypen aus adhärenenten HeLa-Zellen	31
3.1.2.1	Reinigung von 20S Proteasom aus dem Gesamtzell-Lysat von HeLa-Zellen	31
3.1.2.2	Auftrennung der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen	31
3.1.2.3	Analyse von 20S Proteasomen aus HeLa-Zellen nach Inkubation mit $\gamma$ IFN für 48 bzw. 72 Stunden	33
3.1.2.4	Analyse von 20S Proteasom aus HeLa-Zellen nach Inkubation mit $\gamma$ IFN für 144 Stunden	35
3.2	Gibt es 20S Proteasom-Mischkomplexe, in denen sowohl Immuno- als auch konstitutive Untereinheiten vorkommen?	36
3.3	Sind 20S Proteasom-Subtypen in verschiedenen Zellkompartimenten verteilt?	38
3.3.1	Isolierung und Analyse von 20S Proteasom aus dem Gesamt-Zellysat von HeLaS3-Zellen	38
3.3.2	Isolierung von 20S Proteasom aus verschiedenen Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen	40
3.4	Strukturelle Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus verschiedenen Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen	42
3.5	Proteolytische Aktivitäten der einzelnen 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa- bzw. HeLaS3-Zellen	45
3.5.1	Proteolytische Aktivitäten der uninduzierten HeLa –Zellen	45
3.5.2	Proteolytische Aktivitäten der $\gamma$ IFN- induzierten adhärenenten HeLa-Zellen	46
3.5.3	Vergleich der proteolytischen Aktivitäten der 20S Proteasomen-Subtypen aus den einzelnen Zellkompartimenten	46
3.6	Untersuchungen zur Glykosylierung von 20S Proteasom aus HeLa- und HeLaS3-Zellen	48
3.6.1	Glykannachweis mit Lectinen	51
3.6.2	Chemischer Nachweis von Kohlenhydraten in 20S Proteasom	56
3.6.2.1	Nachweis der neutralen Monosaccharide	56
3.6.2.2	Nachweis der Neuraminsäuren	57

3.6.3	Proteolytische Aktivität von cytoplasmatischen 20S Proteasom-Subtypen nach Desialylierung	58
4	Diskussion	60
4.1	20S Proteasom-Subtypen aus Einzelzellen unterscheiden sich strukturell und funktionell voneinander	60
4.2	Einfluß von $\gamma$ IFN und Bildung von 20S Proteasomen-Mischkomplexen führt zu einer Änderung des Subtypen-Musters und der proteolytischen Aktivitäten.	61
4.3	Intermediär-Subtypen des 20S Proteasoms repräsentieren verschiedene Arten von Mischkomplexen	62
4.4	Subzelluläre Lokalisation von 20S Proteasom-Subtypen in HeLaS3-Zellen	64
4.5	Die 20S Proteasom-Subtypen aus den verschiedenen Zellkompartimenten unterscheiden sich strukturell und in ihren proteolytischen Aktivitäten.	66
4.6	Glykosylierung als post-translationale Modifikation	66
4.6.1	Nucleäre und cytoplasmatische Glykosylierung	66
4.6.2	Die Rolle von O-GlcNAc-Modifikationen	67
4.6.3	Glykosylierung des Proteasoms ?	68
	<i>Literatur</i>	70
	Anhang	76
	Abkürzungsverzeichnis	76

## Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System sorgt in eukaryontischen Zellen für einen kontrollierten Abbau von Proteinen. Im diesem Rahmen erfüllt es essentielle regulatorische Aufgaben, z.B. innerhalb des Zellzyklus, bei der Immunabwehr und in der Apoptose. Das 20S Proteasom ist als Multikatalytischer Protease Komplex der zentrale Bestandteil dieses Systems und spielt somit auch in vielen pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit sollte vor allem der Zusammenhang von strukturellen und funktionellen Merkmalen der 20S Proteasom-Subtypen untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass sich gereinigtes 20S Proteasom aus HeLa- und HeLaS3-Zellen chromatographisch in Subtypen auftrennen lässt, die sich in ihrer Struktur und proteolytischen Aktivität unterscheiden. Nach Induktion der HeLa-Zellen mit  $\gamma$ IFN und Ausbildung von Immuno-Proteasomen konnte eine Veränderung des Subtypen-Musters und der Aktivitäten beobachtet werden. Es wurde festgestellt, dass sich hauptsächlich Mischkomplexe bilden, welche sowohl konstitutive als auch Immuno-Untereinheiten enthalten. Mittels HeLa-Zellklonen, welche die ZZ-getagten proteasomalen Untereinheiten LMP2-ZZ bzw.  $\delta$ -ZZ exprimierten, konnte die Kenntnis über das Spektrum der möglichen Mischkomplexe erweitert werden.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass sich die 20S Proteasomen aus den Zellkompartimenten Cytoplasma, Microsomen und Zellkern in ihrem Subtypen-Muster, ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung und ihrer Aktivität unterscheiden.

In einigen früheren Publikationen wurden bereits Hinweise auf Glykosylierungen als post-translationalen Modifikationen des 20S Proteasoms gefunden (Schmid *et al.*, 1993). Nach Inkubation von cytoplasmatischen 20S Proteasomen mit Neuraminidase veränderten sich die Proteinmengenverhältnisse der Subtypen zugunsten einer positiveren Oberflächenladung. Einige proteasomale Untereinheiten reagierten positiv im 2D-PAGE-Blot mit Lectinen spezifisch für Neuraminsäuren (TML, SNA I), N-Acetylglucosamin (WGA, STA) und Mannose (ConA). Auch gelang der Nachweis von Kohlenhydratanteilen in 20S Proteasom aus HeLaS3-Zellen. Erste Untersuchungen der proteolytischen Aktivität zeigten einen schwächeren Umsatz fluorogener Substrate mit den desialylierten Proteasom-Proben.

Die genaue Kenntnis von Struktur und Funktion des 20S Proteasoms ist von großem Interesse im Hinblick auf neue Ansätze in Diagnostik und Therapie vieler humaner Krankheiten.



# 1 Einleitung

## 1.1 Proteinmetabolismus als wichtiges regulatorisches Prinzip

In der belebten Materie findet man als Grundprinzip ein Gleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus, das in unterschiedlicher Art und Weise reguliert wird und den jeweiligen Organismus auf sich verändernde Umwelteinflüsse reagieren lässt. Auf makro- wie auf mikrokosmischer Ebene existieren natürliche Rohstoffkreisläufe, in welchen die beim Abbau anfallenden Grundbausteine wieder dem Aufbau neuer Strukturen zugeführt werden.

Auf zellulärer Ebene wird besonders deutlich, dass es sich hierbei nicht ausschließlich um reines Recycling handelt, sondern dass über kontrollierten Auf- und Abbau z.B. von Proteinen die Regulation lebenswichtiger Prozesse in der Zelle stattfindet. Die Selektivität der intrazellulären Proteolyse kann einerseits durch eine räumliche Trennung gewährleistet werden, wie es z.B. beim lysosomalen Proteinabbau der Fall ist. Lysosomale Proteasen sind hochaktiv aber relativ unspezifisch und die Auswahl der Substrate findet in diesem Falle bei ihrem Eintritt in das membranumschlossene Zellorganell statt. Dem stehen hochspezifische proteolytische Systeme gegenüber, die ihre Substrate an bestimmten Markierungen erkennen und diese gezielt abbauen. Diese Systeme sind entscheidend an verschiedenen Regulationsprozessen im Cytoplasma und Zellkern beteiligt. Ein solches System ist die multikatalytische Proteinase – auch Proteasom genannt.

## 1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Ubiquitin-abhängige Proteinabbau erfolgt durch das 26S Proteasom und dient dem Recycling und dem Entfernen gealterter bzw. schädlicher Proteine in der Zelle. Regulatorische Funktion hat das Proteasom vor allem durch den Abbau von Transkriptions-Faktoren oder deren Inhibitoren. Das Proteasom generiert Peptide, welche von den MHC-I-Molekülen an der Zelloberfläche aller kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Antigene Peptide werden so von den cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) über den CD8+ - T-Zellrezeptor erkannt und die betreffende Zelle wird eliminiert, z.B. indem sie über Cytokinsignale aktiviert wird und die Apoptose durchläuft. Diese Antigene können viraler oder auch körpereigener Natur sein und werden über diesen Weg dem Immunsystem zugänglich gemacht. Es handelt sich dabei um falsch gefaltete, funktionslose Proteine, welche in großer Zahl bei neoplastischen Zell-Transformationen auftreten. Aber auch im physiologischen Proteinstoffwechsel erreichen etwa 30-40% der neusynthetisierten Proteine auf Grund von Fehlern in der Translation oder bei der post-translationalen Modifikation nie ihre eigentliche Form und Struktur und werden in kurzer Zeit wieder abgebaut. Die Existenz von solchen sogenannten metastabilen Proteinen ist schon seit langem bekannt (Wheatley, 1982). Hershko & Ciechanover (1982) fanden, dass kurzlebige Proteine von einem ATP-Ubiquitin-abhängigen Proteolyse-System abgebaut werden. Hough *et al.* (1986) identifizierten das Proteasom als proteolytischen Bestandteil dieses Systems. Es hat sich gezeigt, dass diese kurzlebigen Proteine, auch als DRiPs (**defective ribosomal products**) bezeichnet, eine Quelle für antigene Peptide darstellen, die über den MHC-Klassel-Weg präsentiert werden und durch die das Immunsystem praktisch ständig über den Zustand einer Zelle informiert wird. Beim Auftreten von körperfremden Antigenen infolge pathologischer Prozesse wird die Zelle möglichst schnell aus dem Zellverband isoliert und abgetötet und somit die Verbreitung einer viralen Infektion oder Tumorstadium zu verhindert.

**Tab. 1: Physiologische Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems**

Funktion	Beispiele für Substrate
Immunabwehr	körpereigene und -fremde Proteine im Cytosol und im Kern
Zellzyklus	Cycline, p21
Onkogenese	P53, p27 <sup>Kip1</sup> , bax, I $\kappa$ B
Apoptose	Bcl-2, IAP (Inhibitors of apoptosis proteins), I $\kappa$ B
Entzündungsreaktion	I $\kappa$ B, p105
Stoffwechselregulation	Ornithindecaboxylase, HMG-CoA-Reduktase
Regulation der Genexpression	c-Jun, c-Myk, c-Fos E2F1, I $\kappa$ B, $\beta$ -Catenin

Die meisten wachsenden Zellen durchlaufen eine Serie von kontrollierten Übergängen von einer Phase zur nächsten im Zellzyklus. Dies wird durch den zeitgenauen Abbau von Zell-Zyklus-Regulatoren kontrolliert.

In letzter Zeit wurden sehr viele Untersuchungen mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren durchgeführt, vor allem im Hinblick auf neue Strategien in der Krebstherapie. Diese Substanzen verhindern den Abbau von z.B. Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren und stoppen so den Fortschritt der Zellteilung. Auch werden Entzündungsmediatoren beeinflusst wie NF $\kappa$ B, dessen Inhibitor I $\kappa$ B normalerweise durch das Proteasom abgebaut wird und so eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirkt. Dieser Prozess wird durch Proteasominhibitoren gestoppt. Sie induzieren außerdem eine Caspase-abhängige Apoptose in Tumorzellen (Hideshima *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2003).

### 1.3 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom ist das sogenannte core-Partikel des ATP-Ubiquitin-abhängigen Proteolyse-Systems und stellt eine sehr alte Struktur in der Evolution dar. Das Proteasom ist in Eukaryonten ubiquitär und essentiell (Heinemeyer, 2000), in Archaea ist es ubiquitär, aber nicht essentiell (Ruepp *et al.*, 1998) und in Bakterien kommt es selten vor und ist nicht essentiell (De Mot *et al.*, 1999). Die Quartärstruktur des 20S Proteasoms ist hochkonserviert. Das Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* besitzt das einfachste Proteasom aus zwei verschiedene Untereinheiten, die mit  $\alpha$  und  $\beta$  bezeichnet wurden (Dahlmann *et al.*, 1989). Die Untereinheiten sind in vier heptameren Ringen übereinander angeordnet, wobei die beiden  $\alpha$ -Ringe außen und die katalytisch aktiven  $\beta$ -Ringe innen liegen (Löwe *et al.*, 1995). Das eukaryontische Proteasom zeigt einen komplexeren Aufbau: 28 Untereinheiten, je 14 verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, bilden 4 heptamere Ringe und formen zusammen den zylinderförmigen Komplex mit einer Länge von 15 nm und einem Durchmesser von 11 nm. Die Einteilung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten erfolgte aufgrund von Sequenzhomologien zu den Untereinheiten von *Thermoplasma acidophilum* (Tanaka *et al.*, 1992). Die beiden Ringe aus  $\beta$ -Untereinheiten befinden sich in der Mitte des Komplexes und bilden eine zentrale Kammer, welche das katalytische Zentrum beherbergt. Die beiden Ringe aus  $\alpha$ -Untereinheiten bilden mit den angrenzenden Ringen aus  $\beta$ -Untereinheiten außen jeweils zwei flankierende Kammern. Außerdem dienen sie der Bindung von Regulatorkomplexen (siehe unter 2.2) und bestimmte Aminosäurereste einiger  $\alpha$ -Untereinheiten verschließen die katalytische Kammer und führen so zum sogenannten latenten 20S Proteasom (siehe unten). Die katalytische Aktivität geht von den  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1 ( $\delta$ ),  $\beta$ 2 (Z) und  $\beta$ 5 (MB-1) aus. Aufgrund von Untersuchungen in *S. cerevisiae* mit kurzen, fluorogenen Peptidsubstraten (Orlowski, 1990; Rivett, 1989; Heinemeyer *et al.*, 1991; Hilt *et al.*, 1993) wurden zunächst die einzelnen Untereinheiten für verschiedene proteolytische Aktivitäten verantwortlich gemacht:  $\beta$ 1 ( $\delta$ ) für die PGPH-Aktivität (Spaltung nach sauren Aminosäuren),  $\beta$ 2 (Z) für die tryptische Aktivität (Spaltung nach basischen Aminosäuren) und  $\beta$ 5 (MB1) für die chymotryptische Aktivität (Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren). In späteren Arbeiten an *Mammalia*-Proteasom mit längeren Peptidsubstraten von physiologischer Relevanz zeigte sich jedoch, dass diese Zuordnung

nicht eindeutig erfolgen kann (Eleuteri *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 1999). Die  $\beta$ -Untereinheiten werden mit einer N-terminalen Prosequenz synthetisiert. Während der Assemblierung des 20S Proteasoms kommt es durch autokatalytische Abspaltung der Prosequenz zur Freisetzung der katalytisch aktiven Threonin-Reste (Schmidtke *et al.*, 1996), deren Hydroxylgruppen als Nucleophil an der proteolytischen Spaltung beteiligt sind. Das Proteasom ist somit der Gruppe der N-terminalen nucleophilen Hydrolasen zuzuordnen (Bochtler *et al.*, 1999). In höheren Eukaryonten mit einem adaptiven Immunsystem werden unter dem Einfluss von  $\alpha$ -Interferon drei zusätzliche  $\beta$ -Untereinheiten exprimiert: die sogenannten Immunountereinheiten  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL-1) und  $\beta$ 5i (LMP7). Diese ersetzen die konstitutiven katalytischen Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 und bilden sogenannte Immunoproteasomen (Groll *et al.*, 1997).  $\beta$ 1i (LMP2) hat im Vergleich zu  $\beta$ 1 ( $\delta$ ) eine geringere PGPH-Aktivität,  $\beta$ 5i (LMP7) zeigt wie  $\beta$ 5 (MB1) auch chymotryptische Aktivität und  $\beta$ 2i (MECL1) hat wie  $\beta$ 2 (Z) tryptische Aktivität.

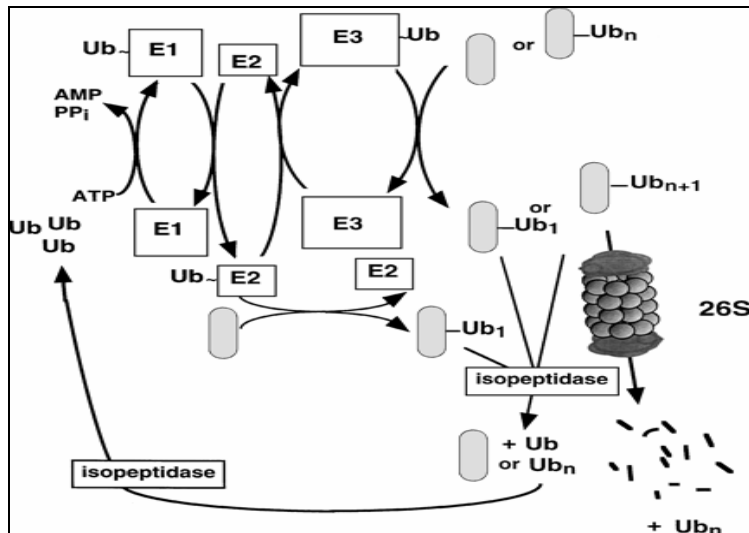
**Tab. 2: Nomenklatur der 20S Proteasom-Untereinheiten (Groll *et al.*, 1997)**

systematischer Name	H. sapiens (M. musculus)	systematischer Name / induzierbare Untereinheit	H. sapiens (M. musculus)/ induzierbare Untereinheit
$\alpha$ 1	$\iota$ (iota)	$\beta$ 1 / $\beta$ 1i	Y ( $\delta$ ) / LMP2
$\alpha$ 2	C3	$\beta$ 2 / $\beta$ 2i	Z / MECL-1
$\alpha$ 3	C9	$\beta$ 3	C10
$\alpha$ 4	C6	$\beta$ 4	C7
$\alpha$ 5	$\zeta$ (zeta)	$\beta$ 5 / $\beta$ 5i	X (MB1) / LMP7
$\alpha$ 6	C2	$\beta$ 6	C5
$\alpha$ 7	C8	$\beta$ 7	N3

Die zwei äußeren  $\alpha$ -Ringe formen in der Mitte ein hydrophobes Zentrum und verschließen das Proteasom. Die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten sind sehr flexibel und interagieren alle mit dem N-Terminus der  $\alpha$ 3-Untereinheit. Eine einzige Punktmutation in diesem Bereich führt zu einer geöffneten Konformation des Hefeproteasoms (Groll *et al.*, 2000). Durch diese Interaktion wird der Substratzugang kontrolliert.

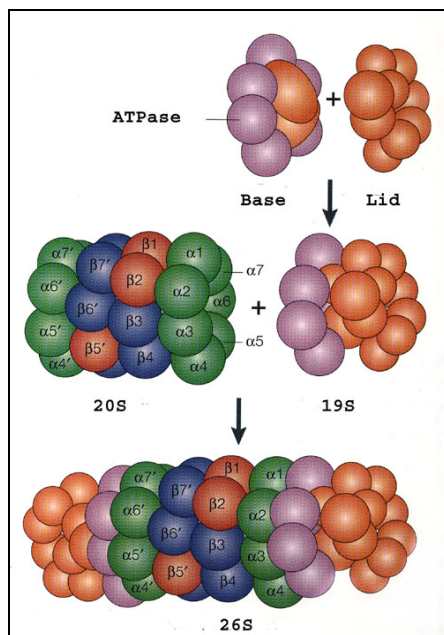
## 1.4 Die Regulatorkomplexe und das 26S Proteasom

*In vivo* findet ein kontrollierter Substratabbau unter Bindung verschiedener Regulatoren an die  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms statt. Solche aktivierenden Regulatoren sind der 11S Komplex PA28 (Yang *et al.*, 1992) und der 19S Regulator auch als PA700 bezeichnet (Chu-Ping *et al.*, 1994; Rechsteiner *et al.*, 1993). In der Zelle ist das 20S Proteasom häufig mit dem 19S Regulator assoziiert. Die Bindung von zwei 19S Komplexen an die  $\alpha$ -Ringe des core-Partikels ist ATP-abhängig und lässt das 26S Proteasom entstehen, einen etwa 2000 kDa großen Komplex. Dieses ist der zentrale Bestandteil des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus in der Zelle. Ubiquitin (Ub) ist ein 76 Aminosäuren langes Protein, welches ubiquitär in vielen Organismen vorkommt. Zum Abbau bestimmte Proteine werden durch Polyubiquitin-Ketten markiert, wobei das Ubiquitin zunächst durch das Ub-aktivierende Enzym E1 ATP-abhängig aktiviert wird. Es wird dann auf das Ub-konjugierende Enzym E2 übertragen, welches dann an die Ub-Ligase E3 bindet. E3 ist seinerseits mit sogenannten F-Box-Proteinen assoziiert, die Target-Proteine erkennen und binden. Findet eine solche Bindung statt, wird die Polyubiquitinkette von E2 auf das abzubauen Target-Protein übertragen. Dieses markierte Target-Protein wird vom 19S Regulator des 26S Proteasoms gebunden, entfaltet und vom Proteasom abgebaut (Goldberg *et al.*, 2001).



**Abb. 1: Das Ubiquitin-Proteasom-System. (Annual Reviews Collection von Weissman, 1997)**

Der 19S Regulator setzt sich aus mindestens 18 Untereinheiten zusammen und wird in Basis- (base-) und Deckel- (lid-) Komplex eingeteilt (Glickman *et al.*, 1998). Der Basis-Komplex bindet an das 20S Proteasom und enthält 6 ATPasen, welche zu den TripleA-ATPasen gehören (*ATPasen associated with a variety of cellular activities*) (Confalonieri *et al.*, 1995; Dubiel *et al.*, 1992). Des weiteren enthält er noch zwei nicht-ATPase-Untereinheiten. Der Deckel-Komplex besteht aus bis zu 10 nicht-ATPase-Untereinheiten. Die ATPasen des Basis-Komplexes besitzen chaperon-ähnliche Funktionen und sorgen für die Bindung und Entfaltung des ubiquitinylierten Substrates. Die Funktion des Deckelkomplexes ist noch weitgehend unbekannt. Durch die Bindung des 19S Regulators wird das Proteasom stark aktiviert, was vermutlich auf ein Öffnen des  $\alpha$ - Ringes beruht. Ein weiterer Regulator-Komplex ist der 11S- oder PA28-Komplex. PA28 bindet ATP-unabhängig an das 20S Proteasom und wird nach  $\gamma$ -Interferoninduktion hochreguliert. In Verbindung mit dem 20S Proteasom werden dann verstärkt antigene Peptide gebildet, welche von MHC-Klasse I-Molekülen gebunden und an der Zellaußenseite präsentiert werden. Der PA28-Komplex besteht im Wesentlichen aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  und es besteht außerdem eine große Homologie zu dem sogenannten Ki-Antigen, welches auch als PA28 $\gamma$  bezeichnet wird (Wilk *et al.*, 2000). PA28 ist ein ringförmiger, wahrscheinlich heteroheptamerer Komplex mit der Stöchiometrie  $\alpha_3\beta_4$  (Knowlton *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999).



**Abb. 2: Das Proteasom:** Das 20S Proteasom setzt sich aus 28 (14 verschiedenen) Untereinheiten zusammen, die beiden äußeren Ringe werden von jeweils sieben  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet (grün). Die beiden inneren Ringe aus jeweils sieben  $\beta$ -Untereinheiten beherbergen das katalytische Zentrum. Für die katalytischen Aktivitäten sind  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  (rot) verantwortlich. Der 19S Regulator-Komplex (auch PA700) besteht aus zwei Subkomplexen: dem Basis-Komplex (*Base*), welcher 6 AAA-ATPasen und zwei Nicht-ATPasen enthält, und dem Deckel-Komplex (*Lid*), welcher aus 10 Nicht-ATPasen besteht. Das 20S Proteasom mit zwei gebundenen 19S Regulator-Komplexen bildet das 26S Proteasom. (Kloetzel, 2001)

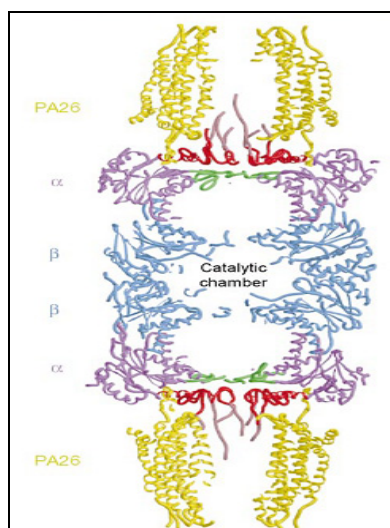
## 1.5 Assemblierung des 20S Proteasoms

Eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und Reifung des core-Partikels spielen Chaperone, wie z.B. hsc70 und das *proteasome maturation protein* POMP (Schmidt *et al.*, 1999). Es werden zwei verschiedene Hypothesen zur Zeit diskutiert: Zum einen vermutet man, dass sich zunächst die  $\alpha$ -Ringe zu noch instabilen Heptameren formieren. Erst nach Bindung der  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 4$  entsteht ein langlebiges Intermediat, sogenannter 13S Precursor, welches in Eukaryonten nachgewiesen wurde (Yang *et al.*, 1995, Schmidtke *et al.*, 1996). Vermutlich binden dann unter Mitwirkung von POMP die noch fehlenden  $\beta$ -Untereinheiten, wobei  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  in der Proform vorliegen, es bilden sich sogenannte Hemi-Proteasomen (300kDa). Durch Dimerisierung entstehen sogenannte 16S Pre-Holo-Proteasomen (600kDa), welche proteolytisch inaktiv sind und den kompletten Satz an Untereinheiten, zum Teil in Form von Proproteinen, enthalten. Erst nach Abspaltung von POMP und autokatalytischer Abspaltung der Prosequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten entsteht das reife 20S Proteasom. Das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von 16S und 20S Proteasom, obwohl die gleichen molekularen Massen vorliegen, wird der kompakteren globulären Form des 16S Komplexes zugeschrieben (Heinemeyer, 2000). Dieses Modell entspricht hinsichtlich der Präassemblierung des  $\alpha$ -Ringes der Biogenese von *Thermoplasma*-Proteasom (Zwickl *et al.*, 1992). Das zweite Modell orientiert sich mehr an Daten, welche bei Untersuchungen an *Rhodococcus* gefunden wurden (Zühl *et al.*, 1997). *Rhodococcus* ist ein Eubakterium mit je 2  $\alpha$ - und 2  $\beta$ -Untereinheiten, welche sehr ähnliche Strukturen haben, wobei die  $\beta$ -Untereinheiten ein sehr langes Propeptid aufweisen. Hier wurde kein freier  $\alpha 7$ -Ring beobachtet, vielmehr lagern sich hier jeweils eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Untereinheit zu Heterodimeren zusammen, wobei jede Kombination möglich ist. Es folgt dann eine schrittweise Zusammenlagerung und die finale Prozessierung zum reifen 20S Proteasom. Neuere Daten aus Experimenten mit Yeast-2-Hybrid-System lieferten Indizien für die Hypothese der frühen Interaktion zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Cagney *et al.*, 2001). Beim Übergang vom 16S zum reifen 20S Proteasom und daraus folgenden Konformationsänderungen sind vermutlich

Das Diagramm illustriert den Prozess der Biogenese des 20S Proteasoms in mehreren Schritten:

- α-Ring Matrix:** Eine kreisförmige Anordnung von grünen Kugeln, die die Vorstufe des Proteasoms darstellen.
- 13S Komplex:** Durch Zugabe von **Ump1p/POMP, andere Faktoren und Chaperone** (gekennzeichnet durch Pfeile) wird ein Komplex mit einem orangefarbenen Ring (POMP) in die Mitte der grünen Kugeln eingebaut.
- 16S Komplex Hemiproteasom:** Dieser Komplex dimerisiert (**Dimerisierung Erster Prozessierungsschritt**) zu einem größeren Komplex aus zwei 13S-Einheiten, die über orangefarbene Strukturen verbunden sind.
- großes Precursorintermediat:** Ein weiterer Schritt führt zu einem noch größeren, ungeordneten Aggregat aus grünen und blauen Kugeln.
- Reifes und aktives 20S Proteasom:** Durch **Abbau von Ump1p/POMP** und **Finale Maturierung** (gekennzeichnet durch einen Pfeil) wird das große Intermediat in das fertige, kompakte 20S Proteasom umgewandelt.

(Groettrup *et al.*, 1996a). Die Immuno-Untereinheiten beeinflussen untereinander nicht nur ihren Einbau, sondern auch die Prozessierung. Griffin *et al.* (1998) zeigten, dass Preproteasomen mit MECL-1 und LMP2 für eine effiziente Prozessierung LMP7 benötigen. Dieser Effekt war nicht von der katalytischen Aktivität sondern von der Prosequenz von LMP7 abhängig. Sie vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse ein kooperatives Modell, bei welchem in den zwei „Haupt-Assemblierungs-Wegen“ entweder reine Immuno- oder reine konstitutive 20S Proteasomen gebildet werden und in untergeordneten „Neben-Wegen“ auch einige gemischte Komplexe entstehen können. Durch  $\gamma$ IFN-Induktion ändert sich die proteolytische Aktivität der Proteasomen. Der Ersatz von  $\delta$  durch LMP2 verringert die PGPH-Aktivität. LMP2 bildet eine kleinere, unpolare Substratbindungstasche (P1 pocket) aus, welche die Bindung von sauren Resten erschwert (Groll *et al.* 1997). Desweiteren besitzt LMP7 zwar wie MB1 hauptsächlich chymotryptische Aktivität, schneidet aber mit größerer Präferenz nach verzweigten Aminosäuren (Eleuteri *et al.*, 1997). MECL-1 hat wie  $\chi$  tryptische Aktivität, bisher ist kein Unterschied in der Schnittpräferenz zwischen diesen beiden Untereinheiten bekannt. Das Immuno-Proteasom schneidet also verstärkt nach basischen und hydrophoben, sowie verzweigten Aminosäureresten und bildet somit Peptide, welche eine höhere Affinität zu TAP- und MHC-Klasse-I-Molekülen besitzen (Kuckelkorn *et al.* 1995). In Untersuchungen an transfizierten *Mammalia*-Zelllinien, welche konstitutiv – also  $\gamma$ IFN-unabhängig – Immuno-Untereinheiten exprimieren, wurden sowohl qualitative als auch quantitative Effekte hinsichtlich veränderter Substratspezifität beobachtet. Einige virale Epitope wurden ausschließlich von Immuno-Proteasomen generiert, während andere nur mit höherer Effizienz gebildet wurden (Sijts *et al.* 2000a und b). Welchen Einfluss hat PA28 auf die Antigen-Präsentation? In Untersuchungen an Zelllinien, welche PA28  $\gamma$ IFN-unabhängig exprimieren, wurde gezeigt, dass die Präsentation einiger viraler Antigene gesteigert ist, obwohl keine Immuno-Untereinheiten vorhanden waren und sowohl der Gesamt-Proteinumsatz, als auch der Umsatz viraler Proteine nicht erhöht war (Groettrup *et al.*, 1996b; van Hall *et al.* 2000). Neuere kinetische Studien deuten darauf hin, dass die Bindung von PA28 die Substrataffinität des Proteasoms erhöht, ohne die maximale Aktivität des core-Partikels zu beeinflussen, vermutlich durch eine verstärkte Aufnahme von Substrat oder eine schnellere Abgabe von Peptiden (Stohwasser *et al.*, 2000). Wahrscheinlich wird das durch eine allosterische Konformationsänderung des Proteasoms und somit eine Öffnung des zentralen Kanals bewirkt, wie es für den PA28-ähnlichen Regulatorkomplex PA26 aus *Trypanosoma brucei* beschrieben wurde (Whitby *et al.* 2000). Die Existenz von heterogenen Komplexen der Zusammensetzung 19S-20S-PA28 lässt vermuten, dass der 19S Regulator geschwindigkeitsbestimmend für die Bindung und den Transport der Substrate ist, während PA28 verantwortlich ist für die Produktfreisetzung (Tanahashi *et al.*, 2000).



**Abb. 4:** 20S Proteasom aus Hefe mit gebundenen PA26-Regulatorkomplexen aus *Trypanosoma*. In dieser Darstellung sieht man die gestreckte Konformation der C-termini der  $\alpha$ -Untereinheiten nach Bindung von PA26, welche in der Regulatorkomplex hineinragen und somit die Öffnung des Kanals des 20S Komplexes bewirken. ( Whitby *et al.*, 2000)



## 1.7 Subzelluläre Lokalisation des Proteasoms

Die Aussage über die Lokalisation des Proteasoms in eukaryotischen Zellen ist generell schwierig. Problematisch dabei ist nicht nur die relativ große Menge an Proteasom in den meisten Zellen (z.B. 0,6% des Gesamtproteingehaltes in HeLa-Zellen), sondern auch die Gewebe-, Entwicklungs- und Zellzyklus-abhängige Variation ihrer Lokalisation. Außerdem ergaben verschiedene Nachweismethoden sehr unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen mit GFP-getagten Untereinheiten oder Antikörpern zeigten meistens eine relativ gleichmäßige Verteilung von 20S-Proteasom im Cytoplasma mit Ausnahme von vakuolären Strukturen wie Lysosomen etc. und eine etwas stärkere Färbung des Zellkernes mit Ausnahme des Nukleolus. Diese etwas höhere Intensität der Zellkernfärbung beruht aber wohl hauptsächlich auf der höheren Dichte der gefärbten Partikel in diesem Kompartiment und nicht auf einem tatsächlich höheren Gehalt. Untersuchungen von Palmer *et al.* (1996), die Rattenleber in die einzelnen Zellkompartimente fraktioniert und die Fraktionen danach mittels Immunoblot gegen 20S-Proteasom-Untereinheiten getestet haben, ergaben folgende Verteilung von 83% cytoplasmatisch, 11% microsomal und 5% nukleär. In der gleichen Arbeitsgruppe wurden zuvor mittels Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie an kultivierten Rattenhepatozyten 17% der 20S Proteasomen im Zellkern lokalisiert (Rivett *et al.*, 1992). Der Unterschied wurde auf die Nachweismethode und nicht auf Verluste bei der Aufarbeitung zurückgeführt. Generell erfolgte zunächst eine Einteilung in cytoplasmatische und nukleäre Proteasomen, wobei die ER-assoziierten mit zu den ersteren gezählt wurden. Cytoplasmatische 20S Proteasomen diffundieren zum größten Teil frei, einige sind mit dem ER und dem cis Golgi assoziiert, einige sind mit Anteilen des Cytoskeletts (z.B. mit Actin- und Intermediärfilamenten und Centrosom) verbunden. Die cytoplasmatischen 20S Proteasomen gewährleisten den "normalen" Proteinturnover, den Abbau von sogenannten DRiPs und innerhalb des UPS (Ubiquitin- Proteasomen-System) den Abbau von nicht mehr benötigten und überalterten Proteinen (s.o.). Den Cytoskelett-assoziierten Proteasomen werden Funktionen innerhalb des Zellzyklus zugeschrieben, z.B. Abbau von Cyclinen und anderen Zellzykluskomponenten. Die ER-assoziierten Proteasomen sind wohl hauptsächlich am ERAD (ER associated degradation) und an der Antigen-Präsentation über den MHC-I-Weg beteiligt. Die Anzahl der 20S Proteasomen im Zellkern unterliegt sehr starken Schwankungen innerhalb des Zellzyklus. Nach einem Modell von Reits *et al.* (1997) findet ein aktiver Transport von 20S-Proteasom aus dem Cytoplasma in den Kern in der G1-, S- und G2-Phase statt, 20S Proteasomen akkumulieren am kondensierten Chromosom. Während der Prophase löst sich die Kernmembran auf und 20S Proteasomen diffundieren zurück ins Cytoplasma und mischen sich in Meta- und Anaphase mit den cytoplasmatischen Proteasomen. Bei der Neubildung der Kernhülle in der Telophase werden frei diffundierende 20S Proteasomen „zufällig mit eingefangen“ und so nucleär lokalisiert. Es wird hier keine strukturelle oder funktionelle Unterscheidung zwischen 20S Proteasomen aus Kern und Cytoplasma vorgenommen. Im Allgemeinen geht man aber davon aus, dass die nukleären Proteasomen hauptsächlich an der Transkriptionsregulation durch den Abbau von Transkriptionsfaktoren und Inhibitoren beteiligt sind (z.B. beim NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B).

## 1.8 Subpopulationen des Proteasoms

Wie aus Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* hervorgeht, verändert sich die Untereinheiten-Zusammensetzung des Proteasoms während der Individualentwicklung (Falkenburg & Kloetzel, 1989). Für *Mammalia* haben Hong *et al.*, 1994, die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten des 20S Proteasoms in drei Kategorien eingeteilt: Konstitutiv, gewebespezifisch und entwicklungsspezifisch, basierend auf der Beobachtung, dass das Untereinheiten-Muster abhängig von seinem Ursprung im Organismus differiert. Dahlmann *et al.* (2000) zeigten, dass das 20S Proteasom in mehreren, chromatographisch voneinander trennbaren Subtypen existiert. Es wurden hier 20S Proteasomen aus verschiedenen Geweben der Ratte untersucht und miteinander verglichen, wobei deutliche Unterschiede der Subtypen-Muster der einzelnen Gewebe erkennbar waren. Als Hauptgrund für das unterschiedliche chromatographische Verhalten der 20S Proteasomen-Subtypen wurde hier der Austausch der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten mit ihren homologen Immuno-Untereinheiten beschrieben und die Subtypen in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: Konstitutiv-, Intermediär- und Immuno-Subtypen. Allerdings gab es in jeder Gruppe mehr als einen Subtyp, was dafür spricht, dass nicht nur der Austausch der  $\beta$ -Untereinheiten eine Rolle bei der veränderten Oberflächenladung spielt, sondern



auch post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, N-Acetylierung und Alkylierungen, sowie alternative Spleißprodukte von Bedeutung sein könnten. Die 20S Proteasomen-Subtypen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Untereinheiten-Zusammensetzung, sondern auch in ihrer Aktivität und zum Teil in ihrer Hemmbarkeit voneinander. Pathologische Prozesse wie z.B. Diabetes mellitus führen zu einer Veränderung im Subtypenmuster. Dies wurde von Merforth *et al.* (2002) anhand von Untersuchungen von 20S Proteasomsubtypen aus Ratten-Skelettmuskel festgestellt. Diabetes mellitus und andere pathologische Prozesse wie Sepsis, Tumorwachstum, chronische renale Dysfunktion und Polytraumata gehen oft mit einem Verlust an Körpergewicht einher, der u.a. auf einem verstärkten Abbau von Muskelprotein beruht, welcher entscheidend vom Ubiquitin-abhängigen Proteasomsystem katalysiert wird. Beweisend hierfür ist die Tatsache, dass der ATP-abhängige Muskelproteinabbau verstärkt ist und durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt werden kann. Außerdem sind die Konzentrationen von mRNAs für Ubiquitin, E2 und E3-Enzyme und proteasomale Untereinheiten erhöht (Attaix *et al.* , 1998).

## 1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

In Geweben sind immer unterschiedliche Zellarten vorhanden, wie Epithelzellen, Fibroblasten, diverse Blutzellen und je nach Gewebe Skelettmuskelzellen, Hepatocyten etc. Aufgrund der o.g. Daten aus Rattengewebe, in welchen unterschiedliche 20S Proteasomen-Subtypen existieren, war es interessant zu erfahren, ob in einzelnen Zellen ebenfalls verschiedene Subtypen vorkommen und wie sie sich gegebenenfalls unterscheiden. Einige Untersuchungen an Rattengewebe und *Mammalia*-Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen einzelne proteasomale Untereinheiten haben gezeigt, dass die Verteilung von z.B. LMP2 und LMP7 in den einzelnen Zellkompartimenten nicht mit der von Gesamtproteasom übereinstimmt (Palmer *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 2000). Möglicherweise existieren in den einzelnen Zellkompartimenten 20S Proteasomen-Komplexe mit unterschiedlicher Zusammensetzung, was sich dann in Form unterschiedlicher Subtypen bemerkbar machen könnte und eventuell auf spezifische Funktionen hindeutet. Außerdem könnten proteasomale Untereinheiten in den einzelnen Zellkompartimenten unterschiedlich modifiziert oder prozessiert sein. Da anzunehmen ist, dass das Proteasom in den verschiedenen Zellkompartimenten spezifische Aufgaben erfüllt, wäre eine strukturelle und funktionelle Diversität durchaus denkbar und sinnvoll. Die vorliegende Arbeit sollte zur Aufklärung dieser Fragen anhand von Untersuchungen mit HeLa- bzw. HeLaS3-Zellen beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Blockthermostat BT 100  
Cryo 1°C Freezing Container  
Eismaschine AF-10  
Elektrophorese Einheit Mighty Small II SE250/SE260  
Elisareader MR5000  
Feinwaage MC1  
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software  
FPLC  
Gefrierschrank -20 °C  
Gefrierschrank -80 °C  
Geltrockner Drystar  
GS-158 Zentrifuge  
Homogenisator  
inverses Mikroskop DMI  
Konduktometer Cond Level 1  
Kühlzentrifuge 54178  
Kühlzentrifuge Avanti J-25  
Kühlzentrifuge J2-HS  
Kühlzentrifuge RC24  
Magnetrührer MR 3001 K  
Medifuge  
Mikrowelle Micro Chef FM 8935  
Netzgerät DC PS3000  
pH-Meter pH Level 1  
Photometer UV-2102 PC Software UV-X101 PC  
Pipetten  
Pipettus-Akku  
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor  
Rotor GA/18  
Rotor SS34  
Rotor SW40  
RT-System  
Schüttler  
Semidry-Blot-Kammer  
Steril gard Hood classII A1 B3  
Stickstofftank  
Ultraschall Sonoplus GM70  
Ultrasenzrifuge L-70  
Ultrasenzrifuge Ultra Pro 80  
Vakuumtrockner  
Vortexer VF2  
Waage BP210OS  
Wasserbad TWB 12  
Wasserbad U3  
Zellkultur-Inkubator BB4220CV  
Kleinfeld  
Nalgene  
Scotsman  
Hoefer  
Dynatech  
Sartorius  
SLT  
Amersham Pharmacia  
Liebherr  
puffer hubbard  
Hölzel  
Beckman  
Braun  
Leica  
InoLab  
Eppendorf  
Beckman  
Beckman  
Sorvall  
Heidolph  
Heraeus  
Moulinex  
Hoefer  
InoLab  
Shimadzu  
Gilson  
Hirschmann  
Amersham  
Beckman  
Sorvall  
Beckman  
Amersham Pharmacia  
Infors  
pQLAB  
Baker  
Taylor-Wharton  
Bandelin  
Beckman  
Sorvall  
Labcono  
Janke & Kunkel  
Sartorius  
Julabo  
Julabo  
Heraeus

## 2.1.2 Chromatographie-Materialien und Fertigsäulen

DEAE Toyopearls 650 S	TosoHaas
MiniQ PC 3.2/3 230 µl	Amersham Pharmacia
Resource™ Q (1ml bzw. 6ml)	Amersham Pharmacia
Resource™ Phe (1ml)	Amersham Pharmacia
Sepharose 6B	Amersham Pharmacia
IgG-Sepharose	Amersham Pharmacia

## 2.1.3 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

3MM Papier	Whatman
Acrylamid (30 %, 29:1)	Roth
Acrylamid (40 %, 39:1)	Roth
Ampholine, Isodalt 3-10	Serva
Ampholine, Isodalt 5-7	Serva
BSA, Fraktion V	Serva
Coomassie® Plus Protein Assay	Pierce
DMSO	Fluka
FCS	Biochrom
fluorogene Peptid-Substrate	Bachem Biochemica bzw. Calbiochem
Interferon-γ rekombinant, human	Roche
Cryoröhrchen	Nunc
L-Glutamin	Biochrom
Lab-trol-E normal	Merz-Dade Switzerland
Magermilchpulver	Difco
Molekulargewichtsstandard, prestained	BioRad
PVDF Membran	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	Seromed
PMSF	Sigma
Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
schwarze Mikrotiter-Platten	Dynatec
Serva Blue G (Coomassie- Farbstoff)	Serva
Sterilfilter 4.5, 0.2 µm	Schleicher und Schuell
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-Amin) Trifluoressigsäure	Serva
Trypanblau-Lösung	Fluka
Trypsin-EDTA	Sigma
Tween 20	Gibco BRL
Zellkultur-Medien	Serva
Zellkultur-Plastikwaren, steril Falcon	Biochrom
Zephiranchlorid, 17 %	Greiner
β -Mercaptoethanol	ICN Serva

## 2.1.4 Antikörper

Untereinheit/Bezeichnung	Origin	Verwendung	Herkunft
LMP2	mAK, Maus	1:1000, Western	Affinity
LMP2 / K863	Kaninchen	1:1000, Western	Institut für Biochemie/Charité'
δ / mcp 421	mAK, Maus	1:2000, Western	Hendil
MECL1 / mc 14	Kaninchen	1:1000, Western	Institut für Biochemie/Charité'
LMP7 / K63	Kaninchen	1:500, Western	Institut für Biochemie/Charité'
MB1 K93250	Kaninchen	1:1000, Western	Institut für Biochemie/Charité'
20S Proteasom / Nr.67	Kaninchen	1:1000, Western	Institut für Biochemie/Charité'
C9 / mcp257	mAK, Maus	1:500, Western	Hendil <i>et al.</i> 1992
C2 / mcp20	mAK, Maus	1:1000, Western	Hendil <i>et al.</i> 1992
C6 / mcp34	mAK, Maus	1:500, Western	Hendil <i>et al.</i> 1992
Zeta / mcp196	mAK, Maus	1:500, Western	Hendil <i>et al.</i> 1992
Z / mcp168	mAK, Maus	1:1000, Western	Hendil <i>et al.</i> 1992
α KaninchenIgG Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:20000, Western	Dianova
α HumanIgG Peroxidase-konjugiert	Ziege	1:10.000, Western	Santa Cruz Biotechnology
α MausIgG Peroxidase-konjugiert	Kaninchen	1:10000, Western	Dianova
α C3 human / MCP21 an Prot.-A-Sepharose gekoppelt	mAK, Maus	Affinitätschromatographie	Hendil <i>et al.</i> 1992

## 2.1.5 Enzyme und Lectine

### Enzyme

Neuraminidase (Sialidase) aus *Arthrobacter ureafaciens* 1U/100 µl Roche

Neuraminidase (Sialidase) aus *Vibrio cholerae* 1U/66µl Sigma

O-Glycosidase (O-Glycan-Peptidhydrolase) aus *Diplococcus pneumoniae* 25mU/50µl Roche

PNGase F aus *Chryseobacterium meningosepticum*, 50U/10 µl Sigma

N – Acetylhexosaminidase aus *Canavalia ensiformis* 5U/100µl Sigma

### Lectine

Lectin aus <i>Tritrichomonas mobilensis</i> (TML), Biotin – Konjugat	Calbiochem
Lectin aus <i>Solanum tuberosum</i> (STA), Biotin – Konjugat	Biomol
Lectin aus <i>Sambucus nigra</i> I (SNA I), Biotin – Konjugat	Biomol
Lectin aus <i>Triticum vulgaris</i> , wheat germ agglutinin (WGA)	Sigma
Extravidin (Streptavidin), Peroxidase – Konjugat	Sigma

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Zelllinien

HeLa (adherent wachsend) : humane Cervical Carcinom Zelllinie

HeLa S3 (als Suspensionskultur) : s. *European tissue culture collection*

T2-Zellen : humane lymphoblastoid B-Zelllinie, TAP-, LMP2- und LMP7-defizient, für MECL1 besteht ein funktioneller knock out.

T2/LMP2+7-Zellen: transfizierte T2-Zellen (s.o.), welche konstitutiv die murinen Proteasomen-Untereinheiten LMP2 und LMP7 exprimiert, funktioneller knock out für MB1 und  $\delta$

ZZ-Zellen: HeLa (adherent wachsend) transfiziert mit den Untereinheiten LMP2 -ZZ bzw.  $\delta$  - ZZ. Diese Untereinheiten sind mit der ZZ-Domäne aus Protein A gekoppelt, welche die Fc-Region von IgG-Molekülen bindet. Es wurde der Vektor pRS304-ZZ von Pharmacia verwendet. Die Transfektion wurde von S. Standera und M. Seeger, Institut für Biochemie/Charité durchgeföhrt, die mir die Zellen freundlicherweise zur Verfügung stellten.

#### 2.2.1.2 Kultur von adherenten Zellen:

Medien: RPMI Medium bzw. ISCOVE Medium mit 10 % FCS 100U/100  $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin, bei den ZZ-Klonen enthielt das ISCOVE Medium zusätzlich 2  $\mu$ g/ml Puromycin

➤ Freezing Medium(2x): 40% RPMI-Medium, 40% FCS, 20% DMSO

➤ PBS: 137 mM NaCl/ 2,7 mM KCl/ 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 x 2H<sub>2</sub>O/ 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / pH 7,2

➤ Trypsin/EDTA-Lösung, 1 : 4 verdünnt mit PBS zum ablösen der Zellen von der Kulturschale

HeLa-Zellen wurden in RPMI Medium bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Wasser zum Befeuchten der Luft im Inkubator war mit 0,068 % Zephiranchlorid versetzt. Zur Induktion der Zellen wurden dem Medium 20U rekombinantes humanes  $\gamma$  - Interferon pro ml Medium zugesetzt und die Inkubation über 48h bis 72h fortgesetzt. Bei langen Induktionen über 5 Tage wurde das Medium nach 3 Tagen einmal gewechselt unter erneuter Zugabe von 20U/ml  $\gamma$  - Interferon. Zum „Ernten“ der Zellen wurde von den konfluent bewachsenen Schalen das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit verdünnter Trypsinlösung von der Schale abgelöst. Entweder erfolgte eine neue Ausplattierung in einer Verdünnung 1 : 3 bis 1 : 10, oder die abgelösten Zellen wurden in eisgekühltem Medium gesammelt, pelletiert und nach einmaligem Waschen mit PBS in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später bei -80°C gelagert. Zentrifugationsschritte erfolgten bei 200g für 5 min bei 4°C.

#### 2.2.1.3 Kultur von Suspensionszellen:

Die HeLa S3- bzw. T2-Zellen wurden zunächst Kunststoff-Kulturflaschen bis zu einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml gezogen und dann in 250ml-Glaskulturflaschen mit eingebautem Rührer in einer 1:2 Verdünnung umgesetzt. Nach Erreichen einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen 1:5 verdünnt und in 3l-Glaskulturflaschen mit Rührer umgesetzt und unter langsamem Röhren weiterkultiviert und alle zwei Tage unter Zugabe von frischem Medium 1:5 verdünnt bis zu einer 2l-Kultur. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren geerntet und die Zellpellets wie oben beschrieben gewaschen und weggefroren.

#### 2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

$1 - 2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden in Cryo-Röhrchen in 1 Volumen 2 x Freezing Medium (in Eis) gegeben und in einem Cryo 1°C Freezing Container über Nacht bei -80°C langsam gefroren (-1°C/min). Eine längere Lagerung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen von Zellen aus dem Stickstoff-

Tank wurden diese im Wasserbad bei 37°C vorsichtig angetaut und dann sofort tropfenweise mit kaltem Kulturmedium (DMSO-frei) versetzt, abzentrifugiert und in 10 ml Medium aufgenommen und ausplattiert bzw. in eine Kulturflasche umgesetzt.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

(nach Bradford, 1976)

Jeweils 20 µl der zu bestimmenden Probe wurden mit je 200 µl der fertigen Gebrauchslösung Coomassie Plus Protein Reagent von Pierce versetzt und nach 5 min Inkubation bei 37°C im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 590nm vermessen. Eine Eichgerade wurde mit einer Verdünnungsreihe aus Lab-trol-E Proteinstandard erstellt.

### **2.2.2.2 TCA Präzipitation**

Die Proben wurden mit 1 Volumen 10% Trichloressigsäure versetzt, auf dem Vortex gemixt und 10 min im Eis stehengelassen. Die Proteine wurden dann durch Zentrifugation bei 14.000g für 5 min (4°C) präzipitiert und die Pellets zweimal mit kaltem Aceton gewaschen.

### **2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen**

( variiert nach Laemmli, 1970)

Puffer und Lösungen:

Upper-Tris-Puffer: 250 mM Tris / HCl pH 6,8 / 0,8 w/v SDS (4 fach konzentriert)

Lower-Tris-Puffer : 150 mM Tris / HCl pH 8,8 / 0,4 w/v SDS (4 fach konzentriert)

Laufpuffer : 190 mM Glycin / 25 mM Tris / 0,1 w/v SDS

Probenpuffer: 120 mM Tris / HCl pH 6,8 / 20 v/v Glycerin / 10 w/v β-Mercaptoethanol / 4 w/v SDS / 0,1 w/v Bromphenolblau

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid

Der Polymerisationsstart erfolgte durch Zugabe von Ammoniumpersulfat 10% und TEMED.

12,5%iges Trenn-Gel: 3,75 ml Acrylamid-Lösung / 2,25 ml Lower-Tris-Puffer / 3,0 ml Wasser / 50 µl APS / 5 µl TEMED

4,5%iges Sammel-Gel: 0,4 ml Acrylamidlösung / 0,75 ml Upper-Tris-Puffer / 1,85 ml Wasser / 12 µl APS / 3 µl TEMED

Molekulargewichtsstandard:

Low Range Marker: 97,4 bis 14,4 kDa (BioRad)

Prestained KaleidokopMarker: 206 bis 7 kDa (BioRad)

Gelgröße: 70 x 80 x 0,75/1,5 mm

Die pelletierten Proben wurden entweder in 1x Probenpuffer aufgenommen bzw. die gelöste Probe wurde mit 1/5 Volumen 5-fach-konzentriertem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C im Heizblock inkubiert und anschliessend mit einer Hamiltonspritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 2h bei 3 Watt.

### **2.2.2.4 2D-Gelelektrophorese Non-Equilibrium-pH-Gradient-Elektrophorese (NEpHGE)**

Bei dieser Form der Gelelektrophorese wurden die Proteine in der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der zweiten Dimension, einer SDS-PAGE, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die in dieser Arbeit vorgestellten NEpHGE-Analysen wurden von I. Wagner, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin, durchgeführt nach der Kleingeltechnik von Jungblut, P.R. (Jungblut & Seifert, 1990).

### **2.2.2.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Färbelösung: 0,25 % (w/v) Servablue G 250 gelöst in Methanol (10% Endkonzentration) , Essigsäure (40% Endkonzentration), Wasser.

Entfärbelösung: 10% Essigsäure, 40 % Methanol, Wasser

Nach beendeter SDS-PAGE wurden die Gele je nach Dicke 20 min bis 1 h gefärbt und bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt ( 1- 3 h ). Die Gele wurden bei Bedarf eingescannt oder in dem Geltrockner auf Whatman-Papier getrocknet.

### **2.2.2.6 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Nach beendeter SDS-PAGE wurden die Gele fixiert:

Fixierer 1: 50 % Methanol / 12 % Essigsäure / 0,5 % Formaldehyd (37% Stammlösung) in Wasser / 20 min Inkubation

Fixierer 2: 3 x 20 min in 50 % Ethanol in Wasser

Danach folgte eine Inkubation für 1 min in Reduktionslösung : 0,8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O Färbung:

20 min in Silbernitratlösung: 10 mM AgNO<sub>3</sub>, 0,5% Formaldehyd (37% Stammlösung)

Danach wurden die Gele 3 x 5 min in Wasser gewaschen und anschließend entwickelt nach Sicht bzw. 20 min:

Entwickler: 560 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> , 20 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O , 0,5% Formaldehyd (37% Stammlösung)

Zum Stoppen der Entwickler-Reaktion wurde eine Lösung 1 % Glycin in Wasser benutzt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden die Gele noch einmal in Wasser gewaschen erneut fixiert in Fixierer 1.

### **2.2.2.7 Immunpräzipitation**

IP-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5 / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 50 mM KCl /10 % Glycerol / 0,1 % Triton X-100 / 100µM PMSF

Waschpuffer: 150 mM bzw. 200 mM KCl gelöst in IP-Puffer

Elutionspuffer: 100 mM Glycin / HCl pH 3,0

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Zellpellets von  $3 \times 10^7$  HeLa-Zellen, welche die Fusionsproteine LMP2 – ZZ bzw.  $\delta$  - ZZ exprimieren, wurden in 500µl IP-Puffer resuspendiert und mit mehrmaligem Gefrieren und Auftauen wurden die Zellen aufgeschlossen (N<sub>2</sub> flüssig/37°C Heizblock). Anschließend erfolgte noch ein Aufschluss der Suspension mit dem Ultraschall – Stab (10 sec). Die Lysate wurden 10 min bei 600g in der Eppendorf-Kühlzentrifuge zentrifugiert um Zelldebris und Zellkerne zu pelletieren. Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt und mit je 100µl IgG-Sepharose, welche vorher mit IP-Puffer äquiliibriert wurde, im Batch-Verfahren für eine Stunde bei 4°C unter konstanter Durchmischung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze erneut 5 min bei 600g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und die Überstände in ein neues Gefäß überführt. Die pelletierte IgG-Sepharose wurde wie folgt gewaschen, zwischen den Waschschritten wurde in der Tischzentrifuge pelletiert:

Waschen mit 1ml IP-Puffer

Waschen mit 1ml 100 mM KCl gelöst in IP-Puffer

Waschen mit 1ml 250 mM KCl gelöst in IP-Puffer

Die Elution der gebundenen 20S Proteasomen erfolgte mit 200 µl Elutionspuffer pro Pellet. Die Elutionsüberstände wurden nach 5 min Zentrifugation bei 600g vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt, das enthaltene Protein mit TCA 10% gefällt und die Proben dann einer SDS-PAGE bzw. NEpHGE unterzogen.

### **2.2.2.8 Westernblot und Immunodetektion**

Transferpuffer: 50 mM Tris / 40 mM Glycin

Um einzelne Protein- Banden bzw. -Spots nach SDS-PAGE immunochemisch nachweisen zu können, wurden die Gele im Semidry-Blotverfahren auf PVDF-Membranen immobilisiert. Dazu wurden die Gele zunächst nach beendeter Elektrophorese 20 min in Transferpuffer äquiliibriert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde zunächst einige Sekunden in Methanol aktiviert und dann ebenfalls in Transferpuffer für 5 min äquiliibriert. Auf die Anode der Semidry-Blotkammer wurde dreilagig mit Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt, darauf die PVDF-Membran, darauf das Gel und auf das Gel wurde wiederum eine dreilagige Schicht puffergetränktes Whatman-Papier gelegt. Nun wurde der Kathoden-Deckel darauf gelegt und befestigt, die Kammer mit der Haube verschlossen und der Transfer bei konstanter Stromstärke von 250 mA gestartet. Der Vorgang war je nach Dicke und Anzahl der Gele nach 15 bis max. 60 min abgeschlossen. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot- Färbung nachgewiesen (siehe Ponceau-Färbung). Wenn kein prestained Marker verwendet wurde, konnten die Marker-Banden auf der Membran gekennzeichnet werden. Die Membran wurde in mit 5 % Milchpulver gelöst in TTBS (50mM

Tris/HCl pH 7,5 / 500 mM NaCl / 0,1 % Tween) mindestens 2 Stunden blockiert, danach dreimal 5 min in TTBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in TTBS / 2 % Milchpulver für 2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 8°C. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TTBS entfernt und es folgte die zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Nach abschliessendem Waschen der Membran mit TTBS zur Entfernung ungebundener Sekundärantikörper konnte die Detektion mittels ECL ( *enhanced chemiluminescence* ) erfolgen.

#### **2.2.2.9 ECL Detektion**

Lösung A: 5 ml 0,1M Tris/HCl pH 8,0 / 22 µl 90 mM Cumarinsäure gelöst in DMSO / 50 µl 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid) gelöst in DMSO

Lösung B: 5 ml 0,1M Tris/HCl pH 8,0 / 3 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Filme: Kodak X-Omat DS Filme

Die Lösungen wurden vor der Reaktion jeweils frisch zubereitet und im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösungen wurden zusammengegeben und die Membran 1 min darin inkubiert. Je nach Intensität erfolgte die Exposition der Filme einige Sekunden bis zu 5 min.

### **2.2.3 Isolierung von 20S Proteasomen aus HeLa- bzw. HeLa S3-Zellen**

Puffer: (Lysispuffer) 10 mM Tris/HCl pH 8,0 / 250 mM Sucrose / 2,5 mM KCl / 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> / 0,5 mM PMSF / ggf. 0,02% NP-40 (bei Gesamtzelllysaten und Microsomenpräparation)

Zellen: Bei -80°C gefrorene aus HeLa bzw. HeLa S3 Zellpellets. Für eine Präparation wurden 5 x 10<sup>8</sup> bis 5 x 10<sup>9</sup> Zellen verwendet. Die verwendeten Zellen stammten entweder aus eigener Kultur oder wurden von der Firma 4C Biotech (Belgien) als gefrorene, teilweise vorfraktionierte Zellpellets (*HeLa S3 whole cells*, *HeLa S3 nuclei*, *HeLa S3 cytoplasm*) bezogen.

Zellaufschluss:

Zellpellets wurden in 5-fachen Volumen mit Lysispuffer unter Eiskühlung resuspendiert und mit einem Homogenisator mit Teflon-Pistill mit 20 Hüben lysiert. Die Zellyse wurde unter dem Mikroskop mit Trypanblau kontrolliert.

#### **2.2.3.1 Differentielle Zentrifugation**

1. Zentrifugation: 1000g, 10 min, 4°C, SS34-Rotor Sorvall

Bei diesem Schritt wurden Zellkerne und größere Zellbruchstücke (Pellet) abgetrennt. Das Pellet wurde für eine spätere Zellkernisolierung zweimal mit Puffer gewaschen und bei -80°C gelagert. Der Überstand wurde mit NP-40, Endkonzentration 0,02% versetzt, gut durchmischt und 10 min im Eisbad gerührt. Danach wurde er der nächsten Zentrifugation unterworfen.

2. Zentrifugation: 15.000g, 20 min, 4°C, SS-34 Rotor Sorvall

In diesem Schritt wurden Zellorganellen wie Lysosomen, Mitochondrien und Peroxisomen pelletiert. Im Überstand befanden sich nach diesem Schritt cytosolische Bestandteile und Microsomen.

3. Zentrifugation: 100.000g, 1 h, 4°C, SW-40 Rotor, Sorvall, Ultrazentrifuge

Nach dieser Zentrifugation befanden sich im S100-Überstand die löslichen cytosolischen Bestandteile und im Pellet die Microsomen, kleinere Fragmente der ER-Membran mit assoziierten Proteinen und Ribosomen. Diese wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis.

#### **2.2.3.2 Isolation von 20S Proteasom aus Cytoplasma**

##### **2.2.3.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie**

Puffer:(TEAD) 20 mM Tris / Hcl pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM NaN<sub>3</sub> / 1 mM DTT

DEAE-Toyopearl 650S mit TEAD äquilibriert

Der Überstand der Ultrazentrifugation bei 100.000g wurde auf die äquilibrierte DEAE-Toyopearl-Säule (30 ml Gelbett) aufgetragen (Flow 1ml/min). Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina TEAD gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in TEAD. Das Volumen des Gradienten betrug zwei Säulenvolumina (bei 30ml Gelbett, 60 ml Elutionsvolumen).



Fraktionsgröße: 1ml

Flußrate: 1ml/min

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre proteolytische Aktivität gegenüber dem chymotryptischen Substrat Suc-LLVY-MCA getestet (s. unter Aktivitätstest ) und die aktiven Fraktionen anschließend gepoolt.

#### **2.2.3.2.2 Ammoniumsulfatfällung**

Die so erhaltene Enzymlösung wurde mittels fraktionierter Ammonium-Sulfat-Fällung weiter aufgetrennt.

1. Fällung bis 35% Sättigung (langsame Zugabe des Salzes unter Rühren im Eis). Nach vollständiger Zugabe des Salzes wurde die Probe noch 30 min im Eisbad gerührt und danach bei 12.000g und 4°C abzentrifugiert.

2. Fällung bis 80% Sättigung: Der Überstand der 1. Fällung wurde durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Sättigung von 80% gebracht ( gleiche Durchführung wie oben ) und nach 30 min Rühren im Eisbad wie oben beschrieben abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in TEAD-Puffer ( max. 2 ml ) aufgenommen.

#### **2.2.3.2.3 Gelfiltration**

Die Gelfiltration wurde mittels FPLC-Anlage durchgeführt.

Säule: präparative Superose 6B, 130 ml Gelbett (50 x 2,0 cm),

Puffer: TEAD

Flußrate: 0,5 ml/min

Fraktionsgröße: 1ml

Die Probe wurde mittels einer 2 ml- Probenschleife aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die proteolytisch aktiven Fraktionen gepoolt.

#### **2.2.3.2.4 FPLC - Anionenaustausch-Chromatographie**

Auch diese Trennung wurde mit dem FPLC – System durchgeführt. Der Auftrag der Probe erfolgte mittels Superloop mit einer Flussrate von 1 ml/min. Säule: Resource Q (6 ml) bzw. Resource Q (1 ml). Die Größe der Säule richtete sich nach der zu trennenden Proteinmenge.

Puffer: TEAD (A) bzw. TEAD + 0,5 M NaCl (B)

Flußrate: 1ml/min

Fraktionsgröße: 1ml

Elutionsschema:

Säule: Resource Q (6 ml)

65 ml von 0 % auf 80 % Puffer B

3 ml von 80 % auf 100 % Puffer B

2 ml 100 % Puffer B

5 ml von 100 % auf 0 % Puffer B

10 ml 0 % Puffer B

Säule: Resource Q (1 ml)

5 ml von 0 % auf 40 % Puffer B

25 ml von 40 % auf 80 % Puffer B

3 ml von 80 % auf 100 % Puffer B

2 ml 100 % Puffer B

5 ml von 100 % auf 0 % Puffer B

Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden gepoolt und über Nacht gegen TEAD dialysiert.

#### **2.2.3.2.5 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Phenylsepharose**

Als nächster Reinigungsschritt schloss sich eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie an. Dazu wurde die dialysierte Probe mit Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gebracht, auf die Säule aufgetragen und die gebundenen Proteine mittels eines absteigenden Ammoniumsulfatgradienten (von 1,4 M auf 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) eluiert.

Puffer: TEAD (A) bzw. TEAD + 1,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,5 (B)

Säule: Resource Phe (1ml)

Flußrate: 1ml/min

Fraktionsgröße: 1ml

Die Säule wurde zunächst mit Puffer B äquilibriert und die Probe mittels Superloop mit einer Flussrate

von 1 ml/min aufgetragen.

Elutionsschema:

10 ml 100 % Puffer B

65 ml von 100 % Puffer B auf 0 % Puffer B

Die proteolytisch aktiven Fraktionen wurden gepoolt und über Nacht gegen TEAD, pH 7,5 dialysiert (Puffer nach 2 h Dialyse einmal gewechselt).

Zur Kontrolle der Reinheit des Proteasomen-Präparates erfolgte eine SDS-PAGE (12,5%) und Coomassie-Färbung.

### **2.2.3.3 Isolation von 20S Proteasom aus Zellkernen**

Die pelletierten Zellkerne wurden entweder aus der zuvor beschriebenen Aufarbeitung der Gesamtzellen erhalten oder von der Firma 4C Biotech (Belgien) bezogen.

Das bei -80°C gelagerte Pellet wurde langsam aufgetaut und zweimal im Lysispuffer gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 2-3 Volumina TEAD/1,6 M Sucrose /5mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und in einem SW40-Ultrazentrifugen-Röhrchen auf ein 2 ml- Kissen von TEAD/2,1 M Sucrose geschichtet. Die Röhrchen wurden mit TEAD/1,6 M Sucrose /5mM MgCl<sub>2</sub> aufgefüllt und in der Ultrazentrifuge 90 min bei 100.000g und 4°C zentrifugiert. Die hochaufgereinigten Kerne sammelten sich an der Grenzschicht zwischen 1,6 M und 2,1 M Sucrose- Puffer als festes Pellet, welches mit einem Mikrospatel herausgenommen werden konnte. Das Pellet wurde im fünffachen Volumen TEAD aufgenommen, resuspendiert und es erfolgte ein Verdau mit DNaseI und RNase (jeweils 100 µg /ml) für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Probe mit dem gleichen Volumen TEAD mit 1M KCl aufgefüllt und 30 min in Eis gerührt. Es folgte eine Homogenisation der Probe mit dem Ultraschall-Stab (3 x 5-10 sec). Die homogene Suspension wurde 60 min bei 100.000g und 4°C abzentrifugiert, wodurch die Kernmembranen pelletiert wurden. Aus dem Nucleoplasma im Überstand wurde das 20S Proteasom durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wie für das Cytoplasma beschrieben gefällt und über Gelfiltration, ResourceQ- und Resource Phe- Säulen weiter gereinigt.

### **2.2.3.4 . Isolation von 20S Proteasom aus Microsomen**

Das Pellet aus dem dritten Schritt der differentiellen Zentrifugation (siehe unter 2.3.2.) wurde langsam aufgetaut, in Lysispuffer resuspendiert und erneut bei 100.000g für 60 min bei 4°C abzentrifugiert .Anschliessend wurden die gewaschenen Microsomen in Lysispuffer/ 0,1 % NP-40 aufgenommen und im Eis mit dem Ultraschall-Stab 3 x 5-10 sec resuspendiert und danach 30 min unter Durchmischung bei 4°C inkubiert. Es folgte eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und die weitere Reinigung wie für Cytoplasma-Proteasom beschrieben.

## **2.2.4 Isolation von 20S Proteasomen mittels Affinitäts – Chromatographie**

Der Zellaufschluß erfolgte in Lysispuffer /0,02% NP-40 bzw. in TEAD/ 0,1% Triton X-100. Es folgte eine differentielle Zentrifugation wie oben beschrieben. Bei Gesamtzell-Präparationen wurden Zelldebris mit 1000g bei 4°C pelletiert und der Überstand nach Zentrifugation bei 100.000g für 60 min bei 4°C wurde weiterverarbeitet. Es folgte eine Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Toyopearl wie unter 2.3.3. beschrieben. Der Pool aus den proteolytisch aktiven Fraktionen wurde über Nacht gegen 20 mM Tris/HCl, pH 7,5/1mM NaN<sub>3</sub> dialysiert um das DTT und das NaCl zu entfernen. Als Ligand der Affinitätschromatographie -Säule diente der monoclonale Antikörper mcp 21, der gegen die proteasomale Untereinheit C3 ( $\alpha$ 2) gerichtet ist und an eine BrCN-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt wurde. Die Säule hatte ein Gelbett von ca. 6 ml. Der Probenaufrag erfolgte auf die mit 20mM Tris/HCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule zwei Stunden im Batch- Verfahren bei 4°C, oder eine Stunde mit langsamer Flussrate über eine Endlosschleife. Es folgten mehrere Waschschrte mit jeweils zweifachem Säulenvolumen:

Waschschrift: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5/ 1mM NaN<sub>3</sub>

Waschschrift: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0/ 1mM NaN<sub>3</sub>/ 50% Ethylenglykol

Waschschrift: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0/ 1mM NaN<sub>3</sub>/ 200 mM NaCl

Elution: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0/ 1mM NaN<sub>3</sub> / 2M NaCl, zwei Säulenvolumina

Das Eluat wurde anschließend gegen TEAD dialysiert und mittels SDS-PAGE auf seine Reinheit überprüft.

## 2.2.5 Analytik der gereinigten 20S Proteasomen

### 2.2.5.1 Trennung der Proteasomen-Subtypen

Die gereinigten 20S Proteasomen wurden im SMART-System einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen.

Puffer A: TEAD pH 7,5; Leitfähigkeit  $\kappa = 1,2 - 1,8$  mS/cm bei 8°C bzw.

Puffer B: TEAD + 0,5 M NaCl pH 7,5 ; Leitfähigkeit  $\kappa = 42 - 48$  mS/cm bei 8°C

Säule: MiniQ PC 3.2/2, 230  $\mu$ l

Probenmenge: 12 – 50  $\mu$ g Protein pro Lauf

Programm:

Flussrate: 200  $\mu$ l / min

0,1 ml – 1,1 ml Probeninjektion über Injektionsventil und Probenschleife ( Je nach Proteinkonzentration der Probe wurde eine 500 $\mu$ l- bzw. 1 ml- Schleife verwendet.)

1,1 - 7 ml von 0% B auf 100 % B

Fraktionierung von 5 ml bis 6,3 ml

Fraktionsgröße: 26,2  $\mu$ l (48 Fraktionen)

7 ml – 8 ml 100% B

8 ml – 8,2 ml von 100 % auf 0 % B

8,2 – 9,5 ml 0 % B

Die Säule wurde mit Puffer A äquilibriert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm, der Gradient wurde mittels Leitfähigkeitsmessung überwacht. Die Leitfähigkeitsmesszelle wurde zuvor mit den verwendeten Puffern kalibriert.

Die getrennten Subtypen der verschiedenen Läufe einer Probe wurden gepoolt und rechromatographiert. Die rechromatographierten Subtypen wurden dann folgendermaßen analysiert: Aktivitätstests mit fluorogenen Substraten Westernblot 2D-Gelelektrophorese

### 2.2.5.2 Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit fluorogenen Substraten

(nach Barret, 1980)

Verwendete Substrate: Stammlösungen 10mM in DMSO

Z-G-G-L-MCA und

Suc-L-L-V-Y-MCA zur Messung der chymotryptischen Aktivität

Bz-V-G-R-MCA zur Messung der tryptischen Aktivität

Z-L-L-E-MCA zur Messung der PGPH-Aktivität

Für den Test wurden Verdünnungen von 50 – 400  $\mu$ M mit Puffer hergestellt.

BzVGR-MCA wurde mit 50mM CAPS/ 0,5 mM DTT, pH 10,5 verdünnt, die anderen Substrate mit TEAD.

Die Substrate tragen am N-terminalen Ende eine Schutzgruppe und sind C-terminal mit einer 4-Methyl-7-cumarylamid-Gruppe (MCA) gekoppelt. Diese Gruppe wird proteolytisch abgespalten, so dass als Spaltprodukt Aminomethylcumarin entsteht, welches über Fluoreszenzmessung quantitativ bestimmt wird. Eine Eichgerade wurde aus einer Verdünnungsreihe aus MCA in TEAD- Puffer erstellt.

Für den Test wurden jeweils 20 $\mu$ l der Probe mit 20 $\mu$ l der Substratlösung in einer schwarzen

Mikrotiterplatte (96 Loch) vermischt und 60 min bei 37°C inkubiert. Das freigesetzte

Aminomethylcumarin wurde im Photometer bei einer Excitationswellenlänge von  $\lambda = 360$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 450$  nm vermessen. Als Leerwert diente Puffer. Die proteolytische Aktivität wurde folgendermaßen bestimmt:

$$A / [\text{pmol MCA/ml} \times \text{min}] = \frac{(\text{F Probe} - \text{F Leerwert}) \times c \text{ std.} \times V \text{ ges.}}{(\text{F std.} - \text{F Leerwert}) \times V \text{ Enzym} \times t}$$

### 2.2.5.3 Verda u der 20S Proteasomen mit Glykosidasen

Es wurden die folgenden deglykosylierenden Enzyme verwendet:

- Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens*: hydrolysiert endständige O- oder N-Acylneuraminsäuren, die in  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 oder  $\alpha$ 2-8 Bindung vorliegen ( $\alpha$ 2-6 >  $\alpha$ 2-3 >  $\alpha$ 2-8)
- Neuraminidase aus *Vibrio cholerae*: wie oben aber mit einer 260fachen Präferenz für  $\alpha$ 2-3 gebundene Neuraminsäuren
- O-Glykosidase aus *Diplococcus pneumoniae*: spaltet das Disaccharid Gal $\beta$ 1-3GalNAc von Serin bzw. Threonin des Proteins/Peptids, nur nach Desialylierung
- PNGase F aus *Chryseobacterium meningosepticum*: spaltet das Disaccharid GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc von Asparagin (nicht terminal) ab, welches mit H oder verschiedenen Oligosacchariden bzw. mit  $\alpha$ 1-6 Fucose substituiert sein kann.
- N-Acetylhexosaminidase aus *Canavalia ensiformis*: spaltet GlcNAc und GalNAc in  $\beta$ 1-2,3,4,6 Bindung von einem beliebigen Rest ab.

Ein Aliquot von 500  $\mu$ l 20 S Proteasomen (Proteinkonzentration: 40  $\mu$ g/ml in TEAD) wurde mit 5  $\mu$ l = 50 mU Neuraminidase (Sialidase) aus *Arthrobacter ureafaciens* (1U = 100  $\mu$ l) für 2 - 30 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert (Optimum bei 16 Stunden).

Ein Verdau mit O-Glykosidase (2,5 mU/ml Probe) und N-Acetyl-Hexosaminidase (0,25U/ml Probe) erfolgte sowohl mit einem Aliquot der gereinigten 20S Proteasomen (40  $\mu$ g/ml) als auch mit der vorher desialylierten Probe für 16 h bei 37°C unter Schütteln. Die Probe wurde danach auf eventuelle Veränderungen im Elutionsmuster am SMART-System analysiert (siehe Trennung der Subtypen). Bei auf PVDF – Membranen geblotteten Proben wurde die Membran für 16 Stunden bei 37°C in einer Lösung des jeweiligen Enzyms inkubiert

Neuraminidase: 100mU/10ml TEAD

O-Glykosidase: 25mU/10ml TEAD (nur nach vorheriger Neuraminidasebehandlung, da nur desialylierte Zucker abgespalten werden können!)

N-Acetyl-Hexosaminidase: 0,25U/10ml TEAD

PNGase F: 1U/ml in PBS

### 2.2.5.4 Lectindetektion

Puffer:

Block-Puffer	20mM Tris/HCl, pH 7,5 0,5M NaCl 2 % Tween
Lectinpuffer I	10mM Tris/HCl, pH 7,5 1M NaCl 1mM CaCl <sub>2</sub> 1mM MgCl <sub>2</sub> 2mM NaN <sub>3</sub>
Lectinpuffer II	10mM Tris/HCl, pH 7,5 150mM NaCl 1mM MnCl <sub>2</sub> 1mM CaCl <sub>2</sub> 1mM NaN <sub>3</sub> 0,1 % Tween
Waschpuffer	TBS: 20mM Tris/HCl, pH 7,5 500mM NaCl bzw. TTBS: 20mM Tris/HCl pH 7,5 500mM NaCl , 0,1 % Tween

Die mit SDS-PAGE bzw. NEpHGE aufgetrennten Proben wurden auf PVDF-Membran geblottet. Die Membranen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer unter Schütteln blockiert und anschließend zweimal mit TBS für 5 min gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Lectin über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler:

Lectin	Konzentration	Lectinpuffer
TML	5µg/ml	I
STA	20µg/ml	II
SNA I	20µg/ml	II
WGA	1µg/ml	I
ConA	20µg/ml	II

Nach der Inkubation (die Lectinlösungen wurden mehrfach verwendet und bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt) wurden die Membranen zweimal mit TTBS 5 min gewaschen und danach mit Extravidin-POD (1:2000 verdünnt in TTBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Membranen zweimal 5 min mit TTBS gewaschen und die Färbung mit ECL detektiert.

### **2.2.5.5 Kohlenhydrat-Analytik**

Die Kohlenhydrat-Analytik wurde von Grunow und Zimmermann-Kordmann am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Charité'-Campus Benjamin Franklin, Berlin, durchgeführt.

#### **2.2.5.5.1 Monosaccharidanalyse**

Die Kohlenhydrat-Reste wurden mittels starker saurer Hydrolyse von den Proteasom-Proben abgetrennt und in Monosaccharide zerlegt. Die Trennung der Monosaccharide erfolgte mittels HPLC an einer Anionenaustauscher-Säule (CarboPac PA1, 4 x 250 mm). Als Vorsäule wurde eine Aminotrap (10-32)-Säule verwendet. Die eluierenden Monosaccharide wurden über gepulste amperometrische Detektion (PAD) nachgewiesen. Die Berechnung der Kohlenhydrat-Mengen erfolgte durch Intergration der Peakflächen im Vergleich mit internen und externen Standards mit bekannter Konzentration.

#### **2.2.5.5.2 Neuraminsäure-Analyse**

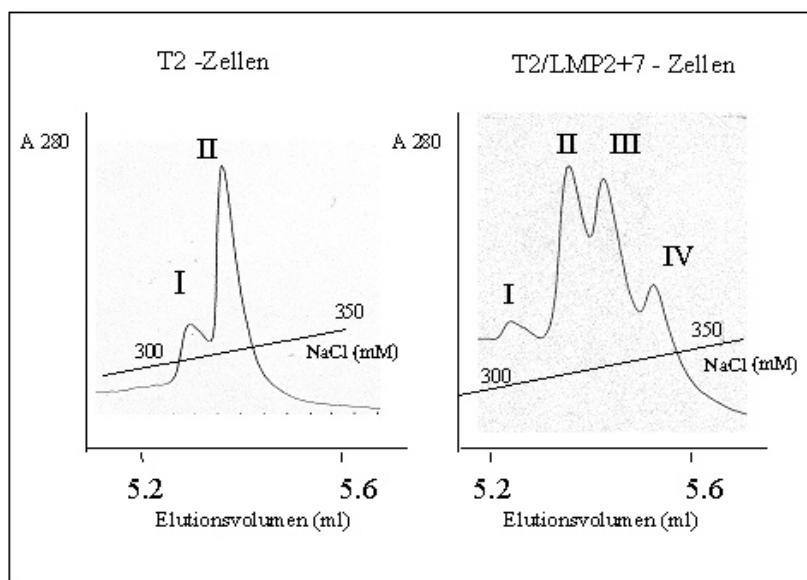
Neuraminsäure-Reste sind meistens endständig an Kohlenhydrate gebunden. Sie wurden mit milder saurer Hydrolyse von den Proteasom-Proben abgetrennt. Die Trennung und Analyse erfolgte wie oben für die neutralen Monosaccharide beschrieben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einzelzellen enthalten mehrere 20S Proteasom-Subtypen

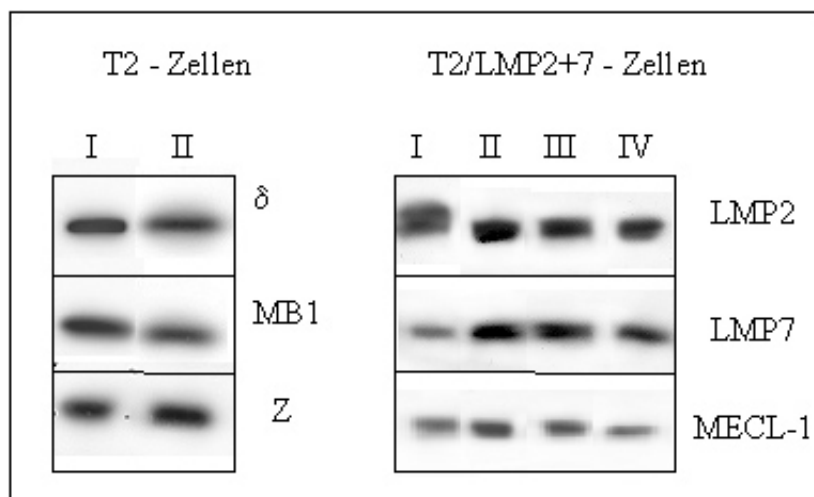
#### 3.1.1 20S Proteasom-Subtypen aus T2- und T2/LMP2+7-Zellen

Gereinigte 20S Proteasomen aus T2- und T2/ LMP2+7- Zellen, die mir freundlicherweise von U. Kuckelkorn (Institut für Biochemie, Charité') zur Verfügung gestellt wurden, konnten mittels Anionenaustausch-Chromatographie an MiniQ P 3.2/3 in mehrere Subtypen getrennt werden. T2-Zellen exprimieren die katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1 ( $\delta$ ),  $\beta$ 5 (MB1),  $\beta$ 2 (Z) und  $\beta$ 2i (MECL-1). Die Untereinheit MECL-1 wird nur in geringem Maß in die 20S Proteasomen-Komplexe eingebaut, da dieser Prozeß stark von der Anwesenheit der Untereinheit LMP2 abhängig ist (Groettrup *et al.*, 1997). Bei den T2/ LMP2+7-Zellen handelt es sich um dieselbe Zelllinie, welche aber mit den murinen Untereinheiten LMP2 und LMP7 transfiziert wurde. Das unterschiedliche Subtypen-Muster ist hier offensichtlich auf den Austausch der  $\beta$ -Untereinheiten zurückzuführen (Abb.5). Die 20S Proteasomen aus diesen Zellen besitzen kein  $\delta$  und kein MB1 (Kuckelkorn *et al.*, 1995).



**Abb. 5: 20S Proteasom-Subtypen aus T2- und T2/LMP2+7-Zellen. Die Subtypen wurden an MiniQ P3.2/3 getrennt.**

Nachfolgend wurden die Subtypen beider Zelllinien auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung hin mittels Westernblot untersucht (Abb.6). Eine Analyse mit Antikörpern gegen die katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten zeigten, dass in allen Subtypen die gleichen Untereinheiten vorkamen. Lediglich bei Subtyp I bei den T2/LMP2+/-Zellen sind bei LMP2 zwei Banden zu erkennen., was hier eventuell für ein Vorhandensein der Proform oder einer Modifikation von LMP2 in diesem Subtyp spricht.



**Abb. 6: Westernblotanalyse der 20S Proteasomen-Subtypen aus T2 und T2/LMP2+7-Zellen. Es wurden die Peak-Fractionen der einzelnen Subtypen auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und die konstitutiven sowie die Immuno-Untereinheiten mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.**

Die untersuchten Zelllinien stellen ein artefizielles System dar. Weitere Untersuchungen wurden deshalb mit HeLa-Zellen durchgeführt, da sie unter Anwesenheit von  $\gamma$ IFN Immuno-Proteasomen synthetisieren und eine Beobachtung von dynamischen Veränderungen möglich war.

### 3.1.2 20S Proteasom-Subtypen aus adhärenenten HeLa-Zellen

#### 3.1.2.1 Reinigung von 20S Proteasom aus dem Gesamtzell-Lysat von HeLa-Zellen

Für die folgenden Untersuchungen wurden adhärent wachsende HeLa-Zellen verwendet. Die Präparation erfolgte im Wesentlichen nach dem von Sobek (1995) erarbeiteten Schema (siehe Tabelle 1 und B:2.3.6.). Am Schluß der Präparation wurde die Reinheit des Präparats anhand einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

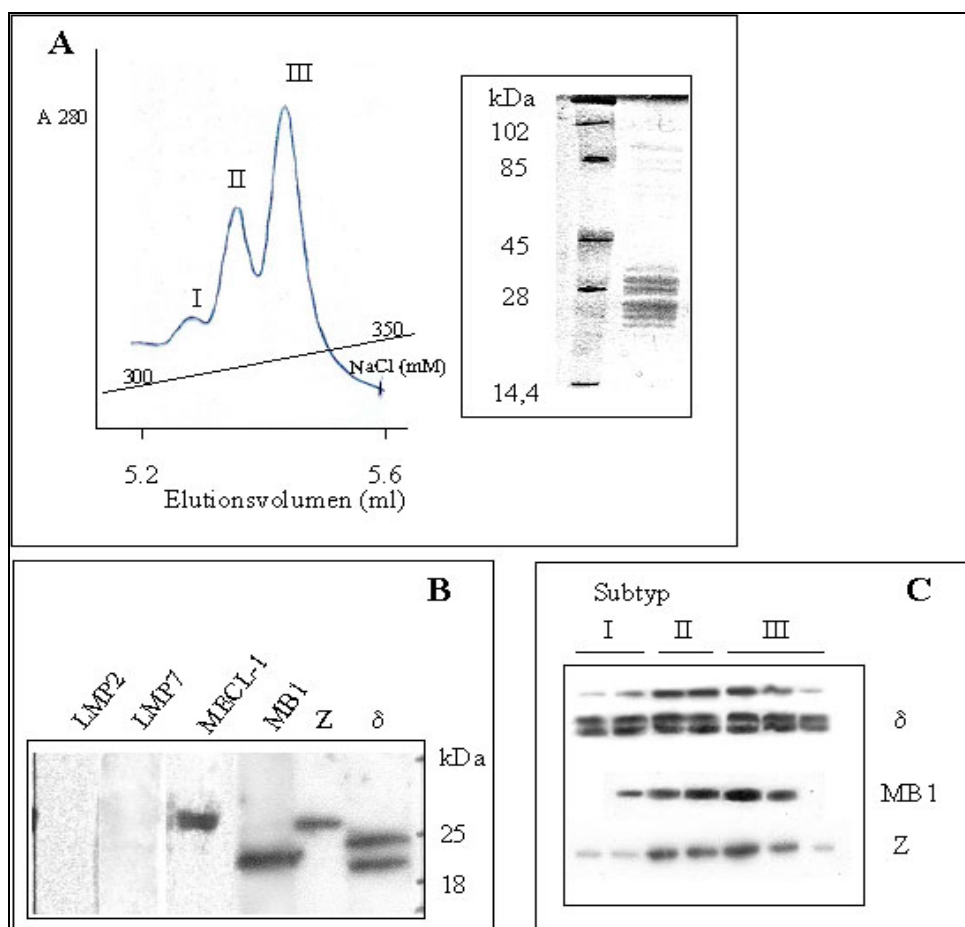
**Tab. 3: Reinigungsschema von 20S Proteasom aus HeLa-Zellen**

Reinigungsschritt	Gesamtproteinmenge (mg)	Gesamt-volumen (ml)	Gesamtaktivität (pmol MCA/min x Gesamtvolumen)	Spezifische Aktivität (pmol MCA/min x mg)	Anreicherungs-faktor
Gesamtzell-Lysat	178,9	32	0,9	0,148	1
UZ-Überstand S100	155,2	28	0,867	0,156	1,05
DEAE-Toyopearl	3	15	0,167	0,759	5,13
Affinitäts-Chromatographie	0,802	33	0,168	6,9	46,6

#### 3.1.2.2 Auftrennung der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen

Aus HeLa-Zellen konnten mit der oben genannten Methode drei Subtypen isoliert werden. HeLa-Zellen besitzen konstitutive Proteasomen. Zunächst vermuteten Dahlmann *et al.* (2000), dass die Ursache für die unterschiedlichen Subtypen der 20S Proteasomen im Austausch der katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten gegen ihre induzierbaren Homologen liegt. Es wurde eine Einteilung in Konstitutiv-, Intermediär- und Immuno-Subtypen vorgenommen, wobei vermutet wurde, dass die

Intermediär-Subtypen sowohl Immuno- als auch Konstitutiv-Proteasomen enthalten. Außerdem wurden noch andere Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glykosylierung u. ä. als Ursache für Subtypen diskutiert. Abb.7A zeigt das Subtypenpattern der gereinigten 20S Proteasomen. In Abb.3B ist zu erkennen, dass HeLa-Zellen konstitutive Proteasomen besitzen. In Abb.7C ist die Untereinheiten-Aufteilung in den einzelnen Subtypen dargestellt. Auffällig sind auch hier die Mehrfachbanden bei  $\delta$ , die möglicherweise Ausdruck für das Vorhandensein von Modifikationen oder alternativer Spleißprodukte sind, aber auch eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen proteasomalen Untereinheiten (LMP2 ist in diesen Zellen nicht vorhanden) darstellen könnten. Die unterschiedliche Intensität der Banden ist auf die Proteinmenge der Peaks zurückzuführen, da die kompletten Elutionsfraktionen aufgetragen wurden. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich hier um Proformen der Untereinheit handelt, da die Präparationen von 20S Komplexen über mehrere Tage erfolgte und die Proben proteolytisch aktiv waren, was für die kurzlebigen Precursor-Komplexe nicht zutrifft. Die positive Reaktion mit MECL-1 in Abb.7B ist wahrscheinlich eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit Z, da die Prozessierung und der Einbau von MECL-1 die Anwesenheit von LMP2 erfordert (Groettrup et al., 1997).

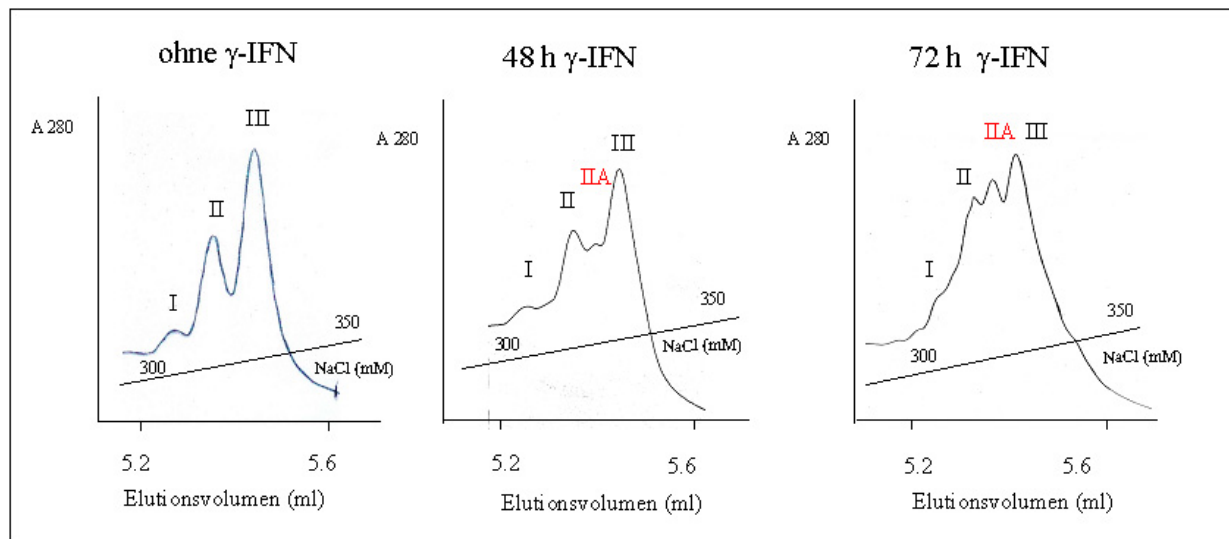


**Abb. 7: 20S Proteasom aus dem Gesamtlysat von HeLa-Zellen. A: Mittels Anionenaustausch-Chromatographie an MiniQ P3.2/3 wurden drei Subtypen getrennt (links). Die Reinheit der aufgetragenen Probe wurde zuvor im SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung überprüft (rechts). B: Immunoblot-Analyse nach SDS-PAGE des Gesamtproteasoms. C: Immunoblotanalyse nach SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen des Elutionsprofils (26µl/Fraktion). Veränderungen im Muster der 20S Proteasom-Subtypen unter dem Einfluss von  $\gamma$ IFN in adhärenenten HeLa-Zellen**

Um zu untersuchen, ob sich das Subtypen-Muster unter dem Einfluss von Immuno-Untereinheiten bei HeLa-Zellen verändert, wurden diese unter Anwesenheit von  $\gamma$ IFN für unterschiedlich lange Zeiträume kultiviert. Die Präparation von 20S Proteasom und die Auftrennung der Subtypen erfolgte wie unter 1.2. beschrieben. Die Abb.8 zeigt die Veränderung der Elutionsprofile in Abhängigkeit von der Zeit.

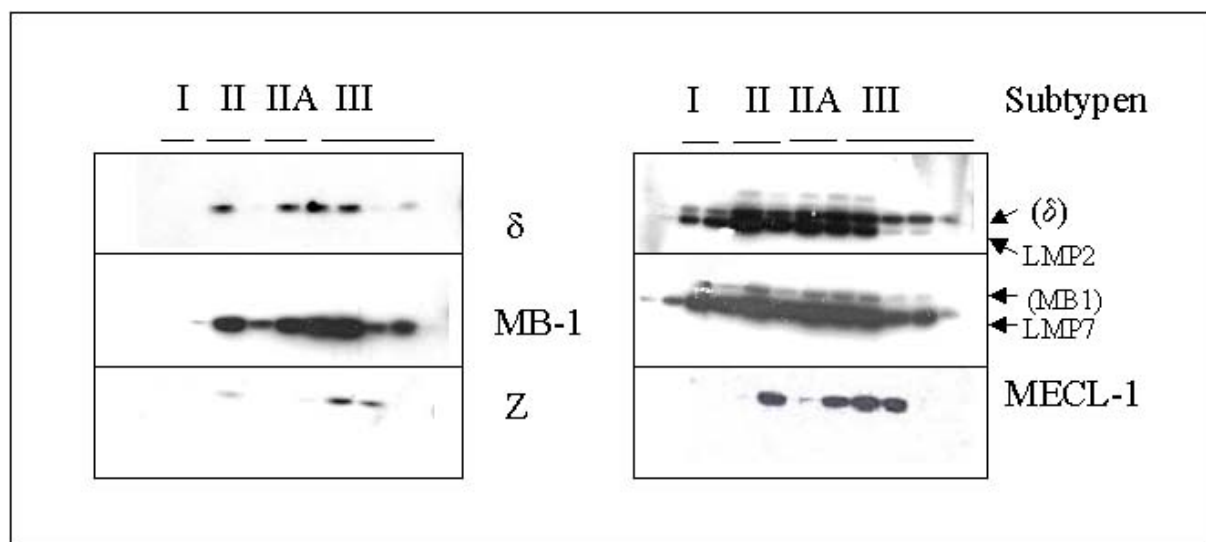


### 3.1.2.3 Analyse von 20S Proteasomen aus HeLa-Zellen nach Inkubation mit $\gamma$ IFN für 48 bzw. 72 Stunden



**Abb. 8:** Elutionsprofile der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen kultiviert in Ab- und Anwesenheit von 20U/ml  $\gamma$ IFN für 48 bzw. 72 Stunden.

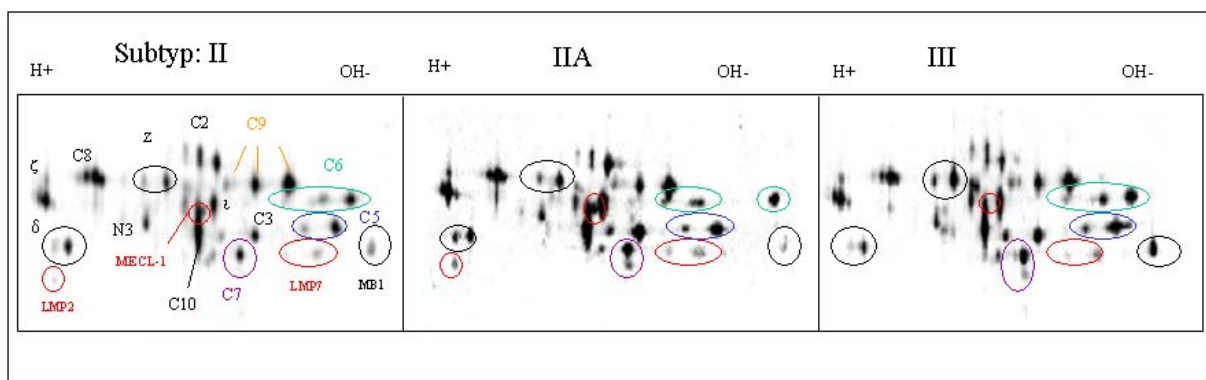
Unter dem Einfluss von  $\gamma$ IFN erschien ein zusätzlicher Subtyp, bezeichnet mit IIA, zwischen den Subtypen II und III, der nach länger dauernder Kultivierung mit dem Cytokin an Menge zunahm. Eine nachfolgende SDS-PAGE der Elutionsfraktionen mit anschließender Westernblot-Analyse sollte über die Untereinheiten-Zusammensetzung Aufschluss geben.



**Abb. 9:** SDS-PAGE und Westernblot-Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen, 72 Stunden unter 20U/ml  $\gamma$ IFN kultiviert. Es wurden die einzelnen Fraktionen (26 $\mu$ l/Fraktion) des Elutionsprofils aufgetragen.

Aus der Abb.9 geht hervor, dass die Immuno-Untereinheiten über das gesamte Elutionsprofil verteilt sind, während die konstitutiven Untereinheiten sich mehr in den spät eluierenden Subtypen II bis III befinden. Alle vier Subtypen sind Intermediär-Typen, wobei in Subtyp III in Anbetracht der Proteinmenge, die er im Profil einnimmt, verhältnismäßig wenig Immuno-Untereinheiten zu erkennen sind. Diese konzentrieren sich am stärksten in Subtyp II und IIA. Von Subtyp I war nur sehr wenig Material vorhanden, was die Aussage über die Untereinheiten-Zusammensetzung erschwert. Bei

LMP2 und LMP7 sind Mehrfachbanden zu erkennen, die möglicherweise eine Kreuzreaktion mit der jeweils homologen Untereinheit darstellen. Bemerkenswert ist, dass nach 72 Stunden Inkubation mit  $\gamma$ IFN weiterhin konstitutive Proteasomen vorhanden sind und offenbar kein kompletter Umbau in Immuno-Proteasomen stattgefunden hat. Die Stabilität von 20S Proteasom in HeLa-Zellen wird mit einer Halblebenszeit von 5,2 Tagen angegeben (Hendil *et al.*, 1988). Anhand neuester Daten aus unserer Arbeitsgruppe wurde eine Halblebenszeit von konstitutiven 20S Proteasomen in HeLa-Zellen von 54 Stunden ermittelt, für Immuno-Proteasomen ist die Halblebenszeit etwas kürzer (Heink, persönliche Mitteilung). Die Anwesenheit von  $\gamma$ IFN induziert zunächst die Neusynthese von Immuno-Proteasomen, wobei noch viele konstitutive 20S Proteasomen vorhanden sind. Damit ist zu erklären, dass nach 48 Stunden unter Wirkung von  $\gamma$ IFN verstärkt die Proformen der Immuno-Untereinheiten, aber auch noch konstitutive Proteasomen nachweisbar sind. Nach 72 Stunden ist allerdings noch immer keine komplette Umwandlung von konstitutiven zu Immuno-Proteasomen zu beobachten. Um eine eindeutigere Zuordnung der Untereinheiten zu ermöglichen, wurden die einzelnen Subtypen an MiniQ P3.2/3 rechromatographiert und die erhaltenen Proben mittels NEpHGE aufgetrennt und anschließend mit Silberfärbung entwickelt (Die NEpHGE wurde mittels Kleingeltechnik von I. Wagner, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, durchgeführt).

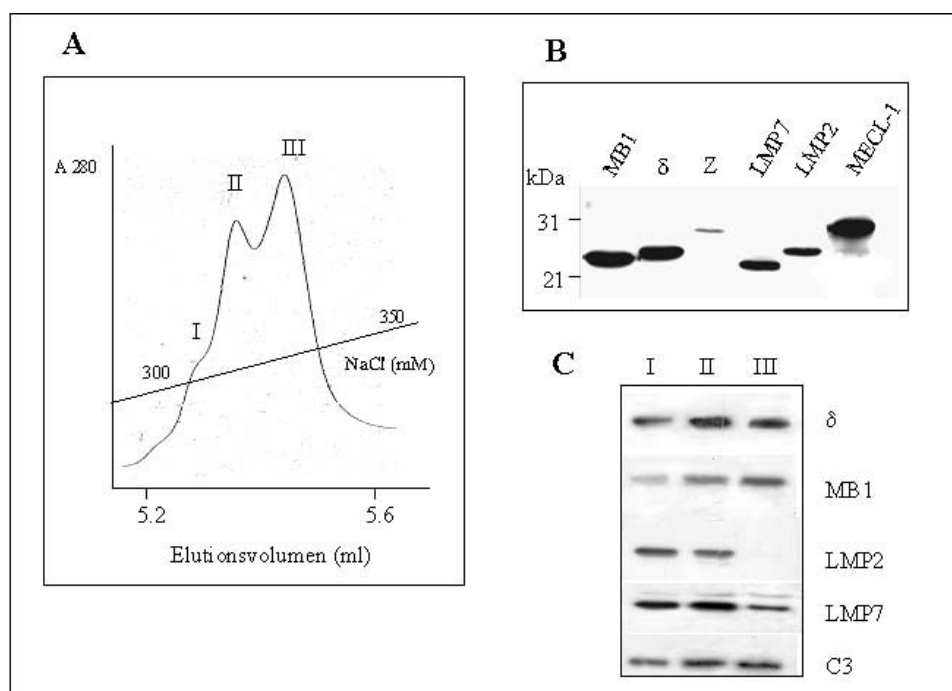


**Abb. 10:** Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen, 72 Stunden unter 20U/ml  $\gamma$ IFN kultiviert, mittels 2D-PAGE. Die rechromatographierten Subtypen wurden in Kleingeltechnik mittels NEpHGE in die Untereinheiten getrennt und anschließend mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Menge von Subtyp I reichte für diese Analyse nicht aus. Von Subtyp II wurden 8,6  $\mu$ g und von Subtype IIA und III wurden 11 $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Zuordnung der Proteinspots zu den Proteasom-Untereinheiten erfolgte nach Claverol *et al.* (2002).

In den in Abb.10 gezeigten 2D-Mustern sind bei allen Subtypen deutlich mehr als 17 Spots zu erkennen. Claverol *et al.* (2002) konnten im 2D-PAGE von 20S Proteasom aus humanen Erythrozyten 32 Spots isolieren, wobei sich die Spots der einzelnen Untereinheiten hinsichtlich ihres isoelektrischen Punktes unterschieden. Dieses Phänomen beruht auf der Existenz von alternativen Spleißprodukten, verschiedenen post-translationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierung) oder auch auf experimentell bedingten Modifikationen der Untereinheiten. Obwohl nicht äquivalente Proteinmengen von den einzelnen Subtypen aufgetragen wurden, erkennt man in Abb.10 deutlich einige qualitative Unterschiede zwischen den 2D-Mustern. Die Positionen der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten wurden mit spezifischen Antikörpern überprüft (Daten nicht gezeigt). Zunächst ist LMP7 in allen dreien enthalten, während LMP2 am stärksten in Subtyp IIA und etwas geringer in Subtyp II vertreten ist. Subtyp IIA enthält die geringste Menge an MB1, dafür relativ viel von  $\delta$  und Z. In Subtyp IIA ist MECL-1 am deutlichsten zu erkennen. Es ist hierbei bemerkenswert, dass sich offenbar alle Subtypen zu Intermediär-Subtypen umgewandelt haben und nicht, wie man aus Abb.8 hätte erwarten können, nur der Subtyp IIA. Subtyp III ist zwar weiterhin der am meisten konstitutive, aber auch hier ist ein Austausch von MB1 zu LMP7 bzw. erfolgt.

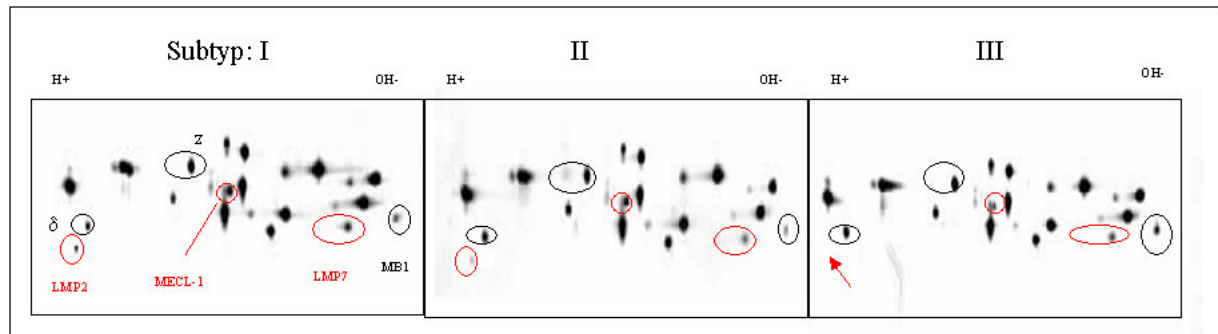
### 3.1.2.4 Analyse von 20S Proteasom aus HeLa-Zellen nach Inkubation mit $\gamma$ IFN für 144 Stunden

Interessant war nun zu erfahren, ob nach längerer Inkubation mit  $\gamma$ IFN ein komplettes Verschwinden von konstitutiven 20S Proteasomen erreicht wird. Deshalb wurden 20S Proteasom-Subtypen aus einer Präparation von HeLa-Zellen, die über 144 Stunden mit 20U/ml  $\gamma$ IFN inkubiert wurden, gereinigt und die Gesamtproteasomen in die Subtypen aufgetrennt (Abb.11). In Abb.11A ist ein im Vergleich zu Abb.8 verändertes Subtypen-Pattern zu sehen. Der Subtyp IIA ist nach längerer Inkubationszeit mit  $\gamma$ IFN in Abb.9A nicht mehr vorhanden (vgl. mit Abb.8 nach 72 Stunden Inkubation mit  $\gamma$ IFN). In der Westernblot-Analyse (Abb.11B) konnten wiederum alle 6 katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten nachgewiesen werden. In Abb. 11C ist auffällig, dass Subtyp III kein LMP2 und weniger LMP7 enthält als die anderen beiden Subtypen. Es handelt sich bei den getrennten Subtypen wiederum um Intermediär-Subtypen, wobei Subtyp III wieder der stärker konstitutive Subtyp ist.



**Abb. 11: 20S Proteasom aus HeLa-Zellen, die 144 Stunden mit 20U/ml  $\gamma$ IFN inkubiert wurden. A: Auftrennung in Subtypen an MiniQ P3.2/3. B: Immunoblot-Analyse des Gesamtproteasoms. (Es wurden je 8 $\mu$ g Protein aufgetragen.) C: Immunoblot-Analyse der 20S Proteasom-Subtypen nach Rechromatographie an MiniQ P3.2/3 (C3 diente als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge, je 5 $\mu$ g).**

Auch nach einer langen Inkubationszeit von 144 Stunden hat kein kompletter Austausch von konstitutiven gegen Immuno-Untereinheiten stattgefunden. Nach 144 Stunden unter Wirkung von  $\gamma$ IFN hatten die HeLa-Zellen stark an Vitalität verloren und teilten sich kaum noch, viele Zellen waren bereits abgestorben. Es ist also nicht davon auszugehen, dass nach noch längerer Inkubationszeit ein kompletter Umbau in Immuno-Proteasomen zu beobachten gewesen wäre. Um die Untereinheiten-Zusammensetzung noch besser untersuchen zu können, wurden zusätzlich noch 2D-Pattern angefertigt.

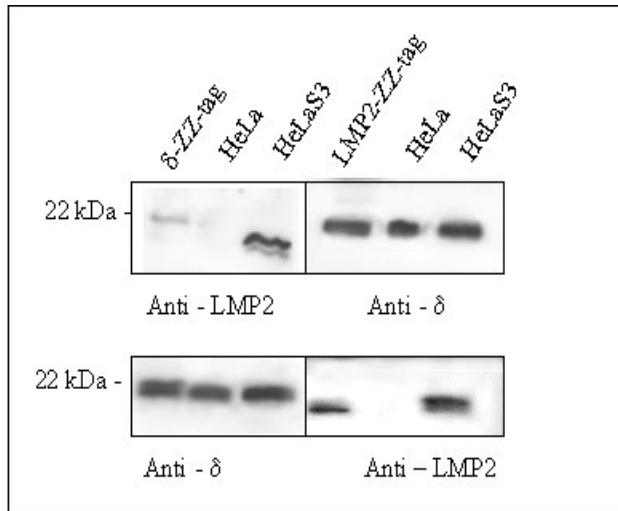


**Abb. 12:** Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen, 144 Stunden unter 20U/ml  $\gamma$ IFN kultiviert, mittels 2D-PAGE. Die rechromatographierten Subtypen wurden in Kleingeltechnik mittels NEpHGE in die Untereinheiten getrennt und anschließend mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Es wurden je 5 $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Zuordnung der Proteinspots zu den Proteasom-Untereinheiten erfolgte nach Claverol *et al.* (2002).

In den 2D-Pattern der Abb.12 sieht man im Vergleich zu Abb.10 nur die Hauptspots der einzelnen Untereinheiten und nur sehr schwach die Nebensspots der modifizierten Formen. Der Grund dafür ist die geringere Proteinmenge in Abb.12, diese Beobachtung machten auch Claverol *et al.* (2002), wenn sie 2D-Pattern von 20S Proteasom mit 40 und 10 $\mu$ g aufgetragenem Protein verglichen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Immuno-Untereinheiten in Subtyp I am stärksten vorhanden sind und  $\beta$ 1 (LMP2) in Subtyp III gänzlich fehlt. Dies bestätigt die Immunoblot-Analyse in Abb.11C.

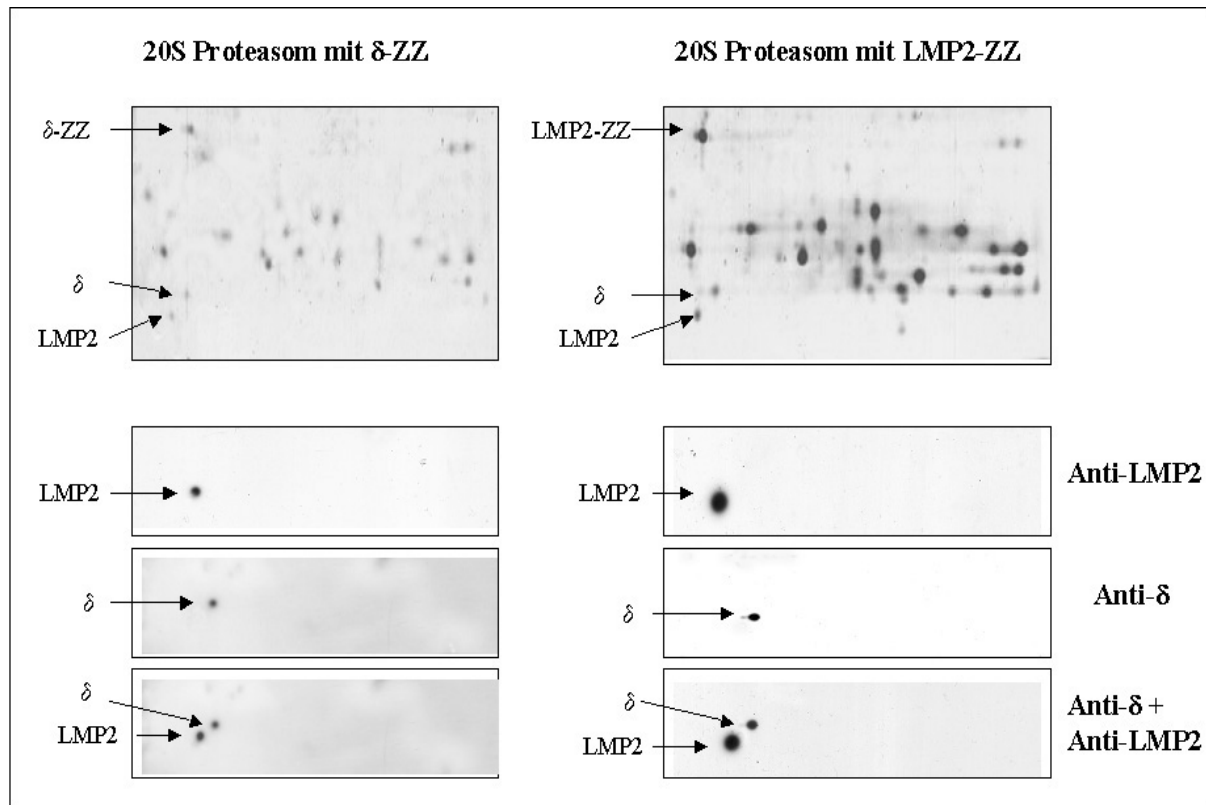
### 3.2 Gibt es 20S Proteasom-Mischkomplexe, in denen sowohl Immuno- als auch konstitutive Untereinheiten vorkommen?

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Versuche zeigen, dass die wenigsten Proteasom-Subtypen den „klassischen“ Konstitutiv- bzw. Immuno-Proteasomen zuzuordnen sind. Die meisten Subtypen enthalten nach den Immunoblot-Analysen sowohl  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 als auch  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 in unterschiedlicher Zusammensetzung. Obwohl diese Subpopulation als „intermediate-type“-Proteasomen bezeichnet wurden (Dahlmann *et al.*, 2000), ist bisher nicht bekannt, ob es sich hierbei um eine Mischung aus Konstitutiv- und Immuno-Proteasomen handelt oder ob diese Proteasomen als Einzelenzyme beide Sorten von  $\beta$ -Untereinheiten,  $\gamma$ IFN-induzierbare und konstitutive, enthalten. Ebenso war nicht bekannt, ob beide Halbproteasomen immer jeweils die gleiche Untereinheit eines Homologen-Paares haben müssen, oder ob hier auch Mischformen möglich sind. Um diese Frage zu beantworten wurden transfizierte HeLa-Zellklone verwendet, die mir freundlicherweise von Seeger (Institut für Biochemie der Charité) zur Verfügung gestellt wurden. Die Klone exprimieren entweder die Untereinheit  $\delta$  oder die Untereinheit LMP2, beide waren jeweils mit der IgG-bindenden ZZ-Domäne (15kDa) aus Protein A markiert. Über diesen „tag“ lassen sich 20S Proteasomen mittels IgG-Sepharose aus dem Zellysat präzipitieren und auf ihre Untereinheiten-Zusammensetzung hin untersuchen. Die transfizierten Zellen wurden in An- und Abwesenheit von  $\gamma$ IFN kultiviert. Die präzipitierten 20S Proteasomenproben wurden mittels SDS-PAGE eindimensional bzw. mittels NEpHGE zweidimensional in ihre Untereinheiten aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen geblottet. Die weitere Analyse erfolgte mittels Antikörpern gegen  $\delta$  bzw. LMP2 (Abb.13).



**Abb. 13: Analyse von 20S Proteasom aus adhären wachsenden HeLa-Zellen, die mit  $\delta$ -ZZ bzw. LMP2-ZZ transfiziert worden sind. Die Proteasomen aus den transfizierten Zellen wurden mit IgG-Sepharose isoliert und anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblot auf das Vorhandensein der Untereinheiten  $\delta$  und LMP2 getestet. Als Kontrollen dienten Extrakte aus adhären wachsenden HeLa-Zellen und in Suspension wachsenden HeLaS3-Zellen. Erstere exprimieren nur konstitutive Proteasom- $\beta$ -Untereinheiten (siehe Abb. 3B), während letztere auch in Abwesenheit von  $\gamma$ IFN konstitutive und Immuno-Untereinheiten exprimieren und somit als Positivkontrolle für LMP2 benutzt wurden.**

Alle Komplexe wurden über den ZZ-tag präzipitiert, das heißt die Komplexe enthielten mindestens eine evtl. zwei der jeweils getagten Untereinheit. Im Falle nur einer getagten Untereinheit in dem einen Hemiproteasom kann das zweite Hemiproteasom entweder die jeweilige ungetagte oder die homologe Untereinheit enthalten. Ohne Induktion mit  $\gamma$ IFN enthalten die 20S Komplexe mit  $\delta$ -ZZ kein LMP2, aber die ungetagte Untereinheit  $\delta$  (22kDa). Die 20S Proteasomen mit LMP2-ZZ enthalten sowohl die ungetagte Untereinheit LMP2 als auch  $\delta$ , hier findet eine Expression von LMP2 in Abwesenheit von  $\gamma$ IFN statt. Die Ergebnisse in Abb.14 zeigen, dass Mischkomplexe, welche sowohl LMP2 als auch  $\delta$  enthalten, prinzipiell gebildet werden können. Es war nun interessant zu erfahren, ob Zellen, die das  $\delta$ -ZZ-Konstrukt enthalten nach Expression von LMP2 mittels  $\gamma$ IFN-Induktion auch diese Untereinheit neben  $\delta$ -ZZ in die Proteasomen einbauen. Die Zellen wurden mit  $\gamma$ IFN (20U/ml) für 24 Stunden induziert und danach geerntet. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben. Die präzipitierten 20S Proteasomen wurden mittels NEpHGE zweidimensional aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und mit Antikörpern gegen LMP2 und  $\delta$  analysiert (Abb.14).



**Abb. 14:** 20S Proteasom aus HeLa-Zellen mit den getagten Untereinheiten LMP2-ZZ bzw.  $\delta$ -ZZ nach Induktion mit  $\gamma$ IFN (20U/ml, 24 Stunden). Die 2D-Pattern oben zeigen die Coomassie-gefärbten Gele. Die Bilder darunter zeigen Immunoblots der 2D-Pattern.

Man erkennt in Abb.14 in den oberen Bildern der 2D-Gele, dass jeweils die getagte Untereinheit und auch beide ungetagten, homologen Untereinheiten vorhanden sind. Nach Induktion exprimieren auch die Zellen mit  $\delta$ -ZZ die Untereinheit LMP2 und bauen sie in die Enzym-Komplexe ein. Dies zeigt, dass Mischkomplexe mit jeder theoretisch möglichen Kombination der Untereinheiten  $\delta$  und LMP2 praktisch vorkommen. Wenn dies für das Untereinheitenpaar  $\delta$ /LMP2 zutrifft ist es sehr wahrscheinlich, dass es auch bei MB1/LMP7 und Z/MECL-1 gleichermaßen der Fall ist, natürlich unter Beachtung bestimmter Assemblierungs-Phänomene (siehe Diskussion, Abschnitt 4.3.).

### 3.3 Sind 20S Proteasom-Subtypen in verschiedenen Zellkompartimenten verteilt?

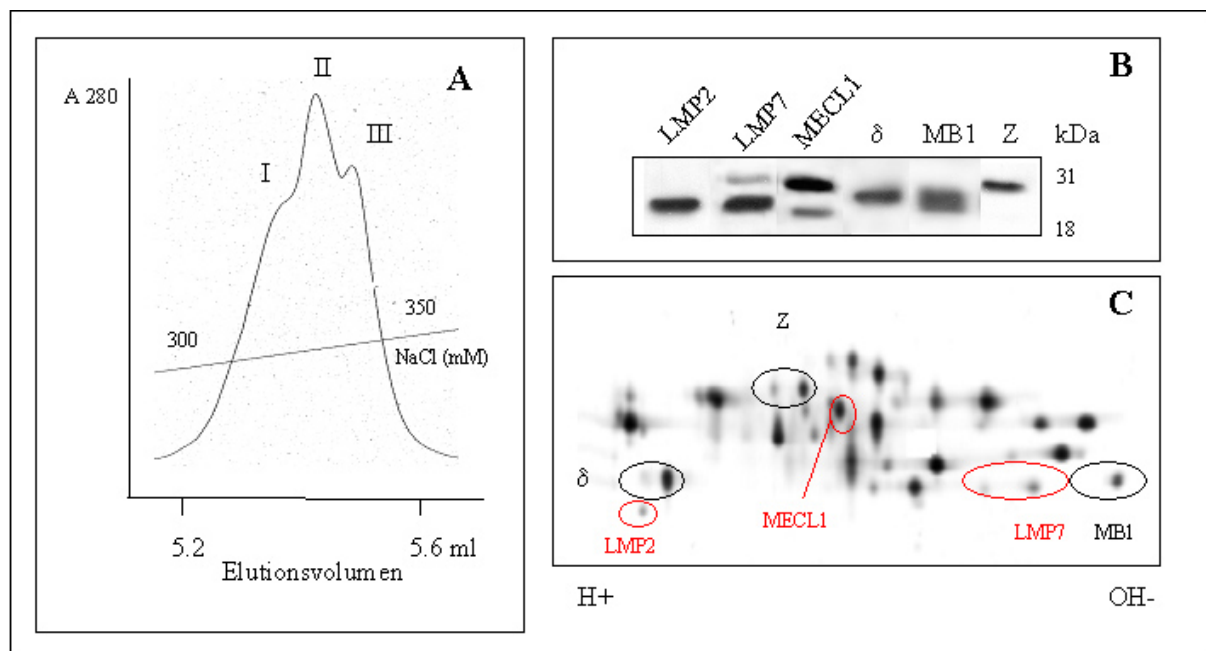
#### 3.3.1 Isolierung und Analyse von 20S Proteasom aus dem Gesamt-Zellysat von HeLaS3-Zellen

Während alle bislang beschriebenen Untersuchungen mit 20S Proteasomen durchgeführt wurden, die aus dem Gesamtzell-Extrakt isoliert worden waren, sollten im folgenden die Subtypen-Pattern von Proteasom aus den verschiedenen Zellkompartimenten untersucht werden. Da für die Fraktionierung in verschiedene Zellkompartimente und vor allem für die Isolierung von 20S Proteasom aus dem Zellkern eine wesentlich größere Menge an Zellen erforderlich war, wurden für die nachfolgenden Versuche in Suspensionskultur wachsende HeLaS3-Zellen verwendet, die zum Teil selbst in Spinnerflaschen gezogen, zum Teil aber auch als Zellpellets von der Firma 4C Biotech (Belgien) bezogen wurden. So konnten Mengen von  $2,5 \times 10^9$  bis  $5 \times 10^9$  Zellen für die Präparation von 20S Proteasom verwendet werden. Da die Reinigungsmethode mit der Affinitätschromatographie durch die Bindungskapazität der Säule auf eine Menge von maximal  $5 \times 10^8$  Zellen begrenzt war, kam hier ein anderes Reinigungsverfahren zur Anwendung, was im Wesentlichen der Methode von Knühl (1999) folgte. Zunächst wurde mit dieser Methode 20S Proteasom aus dem Gesamtzellysat von HeLaS3-Zellen isoliert und diese in Subtypen aufgetrennt und anschließend mittels Immunoblot auf ihre

Untereinheiten-Zusammensetzung analysiert. Das Reinigungsschema ist in Tabelle 2 dargestellt. Eine Übersicht über die Analyse-Ergebnisse zeigt Abb. 15.

**Tab. 4: Reinigungsschema variiert nach Knühl (1999) von 20S Proteasom aus HeLa-Zellen**

Reinigungs-schritt	Gesamt-protein-menge (mg)	Gesamt-volumen (ml)	Gesamt-aktivität (pmol MCA/min x Gesamt-volumen)	Spezifische Aktivität (pmol MCA/min x mg)	Anreicherungs-faktor
Gesamtzell - Lysat	354,6	90	0,29	0,074	1
UZ-Überstand S100	257,6	70	0,33	0,09	1,2
DEAE-Toyopearl	131,5	40	0,57	0,17	2,3
Gelfiltration	46,6	50	0,41	0,44	5,9
1. Resource Q	21,35	70	0,24	0,78	10,6
Phenylsepharose	3,52	65	0,098	1,82	24,5
2. Resource Q	2,25	14	0,455	2,83	38,2



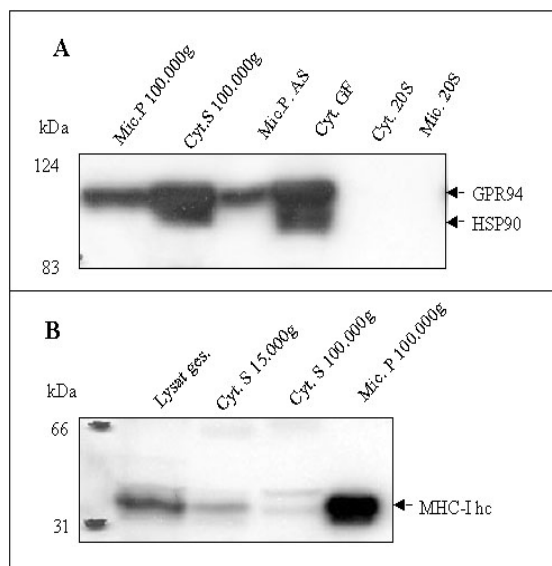
**Abb. 15: 20S Proteasom aus dem Gesamtlisat von HeLaS3-Zellen. A: Auftrennung in Subtypen an MiniQ P3.2/3. B: Immunoblot-Analyse, aufgetragen wurden jeweils 5µg gereinigtes 20S Proteasom. C: NEPHGE-2D-Pattern des gereinigten 20S Proteasoms (aus 5µg).**

HeLaS3-Zellen exprimieren im Gegensatz zu adhären wachsenden HeLa-Zellen auch ohne Induktion durch  $\gamma$ IFN Immuno-Untereinheiten, wie deutlich in Abb.15B und C zu erkennen ist. Auch das Subtypen-Pattern in Abb.15A unterscheidet sich von dem der HeLa-Zellen. Die Position von MECL-1 unterscheidet sich von der bei den adhären, induzierten HeLa-Zellen, der Spot liegt mehr im sauren Bereich und bei höherem Molekulargewicht (Abb. 15C). MECL-1 hat im reifen Zustand ein Molekulargewicht von 25kDa, die Proform wird mit 29kDa angegeben (Foss *et al.*, 1998; Groettrup *et*

al., 1997). Auch in Abb.15B ist mit dem spezifischen Antikörper gegen MECL-1 zwei Banden angefärbt worden. Es ist unklar, ob es sich hier eventuell um die unprozessierte Form von MECL-1 handelt.

### 3.3.2 Isolierung von 20S Proteasom aus verschiedenen Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen

Wie im Methodenteil beschrieben, erfolgte die Lysis der HeLaS3-Zellen unter Bedingungen, welche die Zerstörung der Kernmembran verhindern sollten. Die Trennung der Kompartimente Zellkerne, Microsomen und Cytoplasma erfolgte im Wesentlichen über differentielle Zentrifugation. Die einzelnen Fraktionen wurden danach separat weiter nach der Methode von Knühl (1999) aufgearbeitet. Um die Trennung der Kompartimente zu kontrollieren, wurde die An- bzw. Abreicherung bestimmter Markerproteine mittels Immunoblot-Analyse verfolgt. Für die Kernfraktion wurden humane Antiseren mit snRNP-Antikörpern verwendet, da snRNPs sich im Nucleoplasma befinden und ihr Vorhandensein in der Kernfraktion sowohl eine Anreicherung von Zellkernen als auch einen Erhalt der Kernmembran und Kernporen anzeigt. Die Microsomen bestehen aus Resten von ER- und Golgi-Membranen, die nach der Zell-Lysis neue Vesikel formen und membran-assoziierte Proteine teilweise einschliessen, so dass diese in der microsomalen Fraktion angereichert werden. Als Marker für die microsomale Fraktion wurden Antikörper gegen GPR94 (94kDa) und gegen MHC-Klasse I heavy chain (MHC-I hc, 43kDa) verwendet. GPR94 ist ein Protein, das sich löslich im ER-Lumen befindet, während MHC-I hc-Moleküle integrale Membranproteine sind, die aus dem ER über Golgi-Apparat in Vesikeln schließlich zur Zellmembran transportiert werden. Letzteres erwies sich somit auch als der bessere Marker für die microsomale Fraktion. Das *heat shock protein* 90 (HSP90, 90kDa) diente als Kontrolle für die cytoplasmatische Fraktion, da dies ein cytosolisches Protein ist.

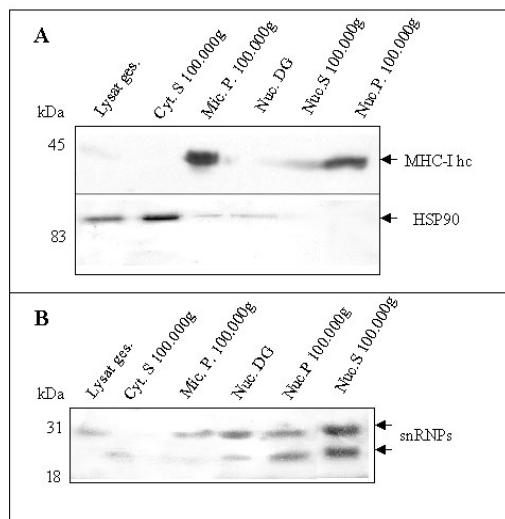


**Abb. 16: Kontrolle der Kompartiment-Trennung von Cytoplasma und Microsomen aus HeLaS3-Zellen mittels Immunoblot-Analyse.** A: Es wurden jeweils 10µg Protein aufgetragen vom Microsomen-Pellet der Ultrazentrifugation bei 100.000g (Mic. P. 100.000g); Cytoplasma-Überstand der Ultrazentrifugation bei 100.000g (Cyt. S. 100.000g); Microsomen-Pellet der Ammoniumsulfat-Fällung (Mic. P. AS); Cytoplasma nach Gelfiltration (Cyt. GF); gereinigtes cytoplasmatisches 20S Proteasom (Cyt. 20S); gereinigtes microsomales 20S Proteasom (Mic. 20S). B: Es wurden jeweils 10µg Protein aufgetragen vom Gesamtzell-Lysat (Lysat ges.); Cytoplasma-Überstand ohne Zellorganellen nach der Zentrifugation bei 15.000g (Cyt. S. 15.000g); Cytoplasma-Überstand nach Ultrazentrifugation bei 100.000g (Cyt. S. 100.000g); Microsomen-Pellet nach Ultrazentrifugation bei 100.000g (Mic. P. 100.000g).

In Abb. 16A ist deutlich zu erkennen, dass in der microsomalen Fraktion kein cytoplasmatischer Marker (HSP90) mehr nachweisbar ist, während es in der cytoplasmatischen Fraktion angereichert wird. GRP94 findet sich sowohl im Membranpellet als auch in der löslichen Fraktion, was ein Indiz dafür ist, dass ER-Membranen bei der Reinigungsprozedur zerstört werden. In Abb.16B ist deutlich



die Anreicherung von ER-Membranen in der microsomalen Fraktion anhand der intensiver werdenden Bande von MHC-I hc zu erkennen.



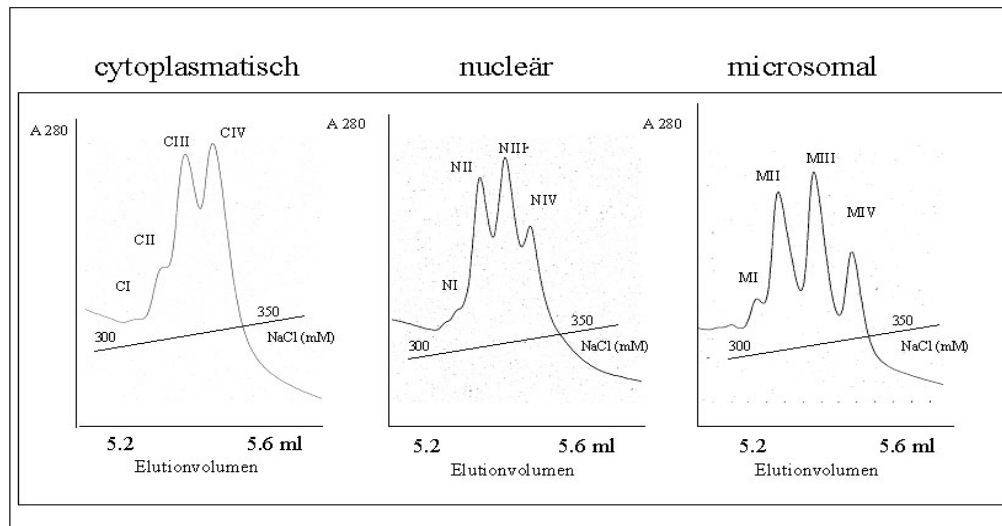
**Abb. 17: Kontrolle der Anreicherung von Kern-extrakt aus HeLaS3-Zellen mittels Immunoblot-Analyse. A und B: Es wurden jeweils 10 µg Protein aufgetragen vom Gesamtzell-Lysat (Lysat ges.); Cytoplasma-Überstand nach Ultra-zentrifugation bei 100.000g (Cyt. S 100.000g); Microsomen-Pellet nach Ultrazentrifugation bei 100.000g (Mic. P 100.000g); angereicherte Kernfraktion nach Dichtegradienten-Zentrifugation (Nuc. DG); Kernextrakt, Überstand nach Ultra-zentrifugation bei 100.000g (Nuc. S 100.000g); Kernmembran und assoziierte ER-Membranen, Pellet nach Ultra-zentrifugation bei 100.000g (Nuc. P 100.000g).**

Bei der Isolierung des Kernextraktes war es nötig, dass die Kernmembran möglichst erhalten blieb, damit die im Nucleoplasma löslichen 20S Proteasomen angereichert werden konnten. Erst nach dem enzymatischen Verdau der Nucleinsäuren wurden mit 0,5M KCl die Kernporen und -membran permeabel gemacht, so dass das Nucleoplasma austreten konnte und durch Ultrazentrifugation bei 100.000g von den Kernmembranen (Pellet) abgetrennt wurde. In Abb. 17A ist zu erkennen, dass sich die ER-Membranreste des *nuclear envelope* nach der Ultrazentrifugation im Pellet befinden (Mic. P 100.000g als Positivkontrolle). Die Abtrennung von cytoplasmatischen Komponenten wurde mittels Nachweis des cytosolischen Proteins HSP90 überprüft. In Abb.17A (unteres Bild) ist ein deutliches Signal von HSP90 im Gesamtlisat und in der cytoplasmatischen Fraktion zu erkennen. Die microsomale sowie die nucleäre Fraktion zeigt nur noch ein sehr schwaches Signal, HSP90 wird bei der Präparation zu einem geringen Anteil mit 20S Proteasom copräpariert und erst im letzten Reinigungsschritt, der hydrophoben Interaktions-Chromatographie, vollständig abgetrennt. In Abb. 17B wurde ein humanes Antiserum mit anti-snRNP-IgG ( Titer 1 : 2.000) für den Blot verwendet. Die small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) sind essentielle Komponenten für das eukaryontische pre-mRNA-splicing, sie befinden sich löslich im Nucleoplasma und waren somit ein guter Marker für dessen Anreicherung. Es finden sich die stärksten positiven Signale im Kernextrakt-Überstand nach Ultrazentrifugation. Auch in der Kernmembranfraktion (Nuc. P 100.000g) sind snRNPs nachzuweisen, allerdings schwächer als im Kernextrakt. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um snRNPs, welche mit Kernmatrix assoziiert sind. In den verschiedenen eukaryontischen Zelltypen variiert die Verteilung von 20S und 26S Proteasom sehr stark. Umfangreiche Untersuchungen hierzu wurden von Palmer *et al.* (1996) durchgeführt. Bei Isolation von 20S Proteasom aus Rattenleber ermittelten sie eine Verteilung 83 % zytoplasmatisch, 5,4 % nuclear und 11,3 % microsomal, wobei die Verteilung einzelner proteasomaler Untereinheiten nicht einheitlich war. In HeLaS3-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit folgende Verteilung von 20S Proteasom ermittelt werden, bezogen auf Gesamtproteasom der Zelle (100%) anhand der im einzelnen präparierten Proteinmengen:

Cytoplasma	70 – 72 %
Microsomen	25 – 27 %
Nuclei	3 – 5 %

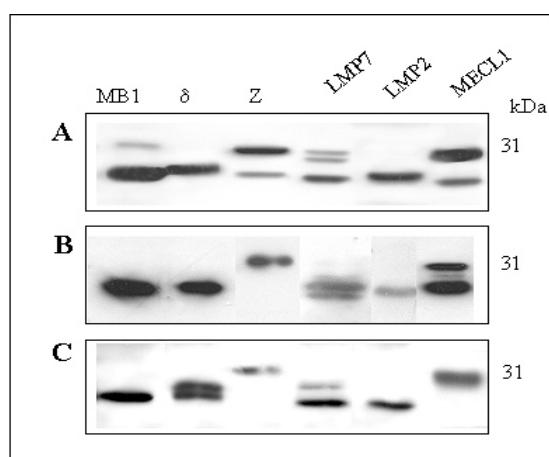
### 3.4 Strukturelle Analyse der 20S Proteasom-Subtypen aus verschiedenen Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen

Die gereinigten 20S Proteasomen aus den einzelnen Zellkompartimenten wurden an MiniQ P3.2/3 in ihre Subtypen aufgetrennt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede der Elutionsprofile von cytoplasmatischen, microsomalen und nucleären 20S Proteasomen-Subtypen (Abb. 18).



**Abb. 18:** Elutionsprofile der 20S Proteasomen-Subtypen aus den einzelnen Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen

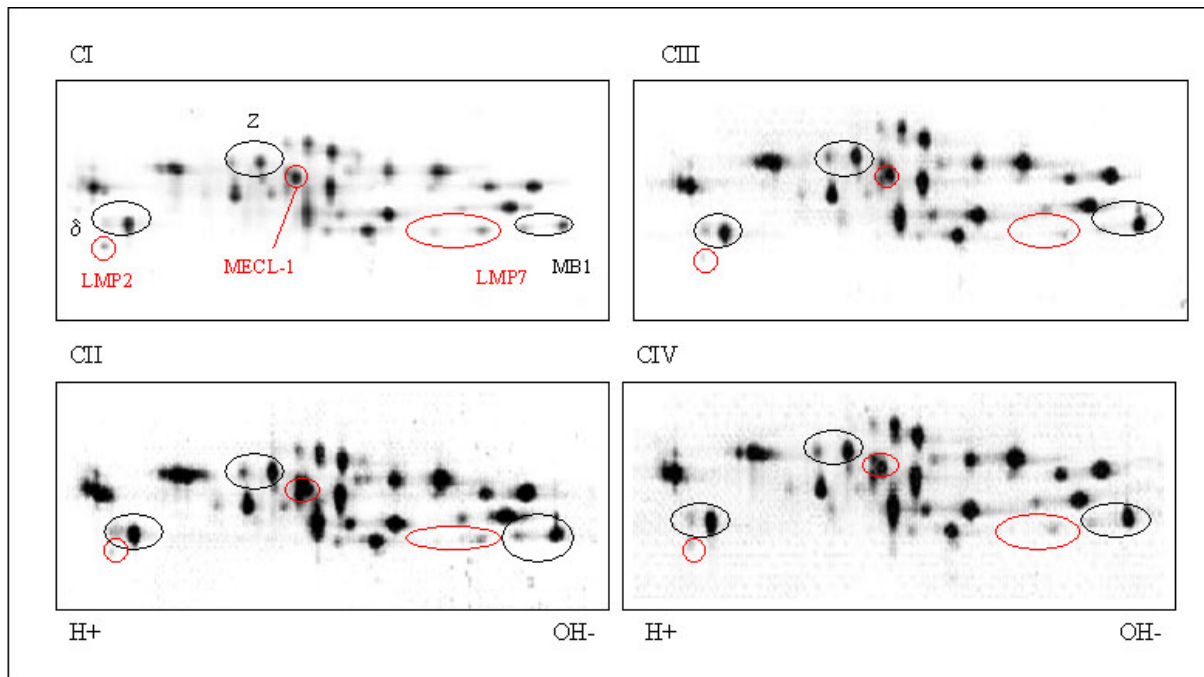
Obwohl sich die 20S Proteasomen aus allen drei Zellkompartimenten jeweils in vier Subtypen auftrennen ließen, ist deren quantitative Verteilung allerdings unterschiedlich. Um Informationen über die Untereinheiten-Zusammensetzung der Gesamt-Proteasomen der einzelnen Zellkompartimente zu erhalten, wurde zunächst eine SDS-PAGE mit nachfolgender Immunoblot-Analyse durchgeführt.



**Abb. 19:** Immunoblot-Analyse der 20S Proteasomen der einzelnen Zellkompartimente von HeLaS3-Zellen. A: Cytoplasma; B: Microsomen; C: Nuclei. Es wurden jeweils 10µg gereinigtes 20S Proteasom aufgetragen. In Abb. 19 ist zu sehen, dass in allen Kompartimenten sowohl Immuno- als auch konstitutive Untereinheiten vorhanden sind. Aber auch hier sind deutliche Unterschiede zwischen den 20S Proteasomen aus den einzelnen Zellkompartimenten erkennbar. Die cytoplasmatischen Proteasomen zeigen bei MB1, LMP7, Z und MECL-1 höhermolekulare Banden über denen der reifen Untereinheit. Es sind hier, wie schon erwähnt,

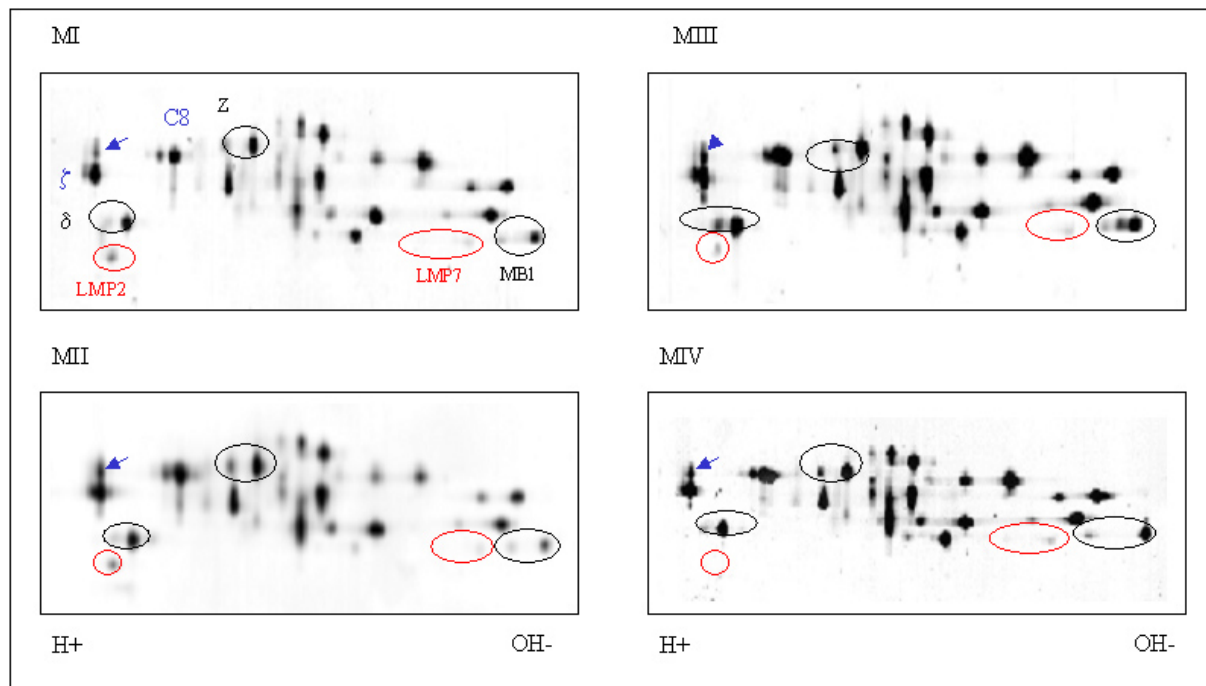
eher Kreuzreaktionen mit anderen Untereinheiten als Proformen anzunehmen, da die 20S Proteasomen proteolytisch aktiv waren. Bei MECL-1 ist allerdings wegen der veränderten Position des Spots in der 2D-PAGE auch das Vorhandensein der Proform möglich. Es wurden bei allen Analysen für die einzelnen Untereinheiten derselbe Antikörper verwendet, es zeigten sich aber zum Teil deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Bandenmuster. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf verschiedene Modifikationen der entsprechenden Untereinheit. Eventuell könnten dies Gründe für die unterschiedlichen Subtypen-Pattern der 20S Proteasomen sein.

Nachfolgend wurden 2D-Pattern der einzelnen Subtypen aus den drei Zellkompartimenten erstellt.



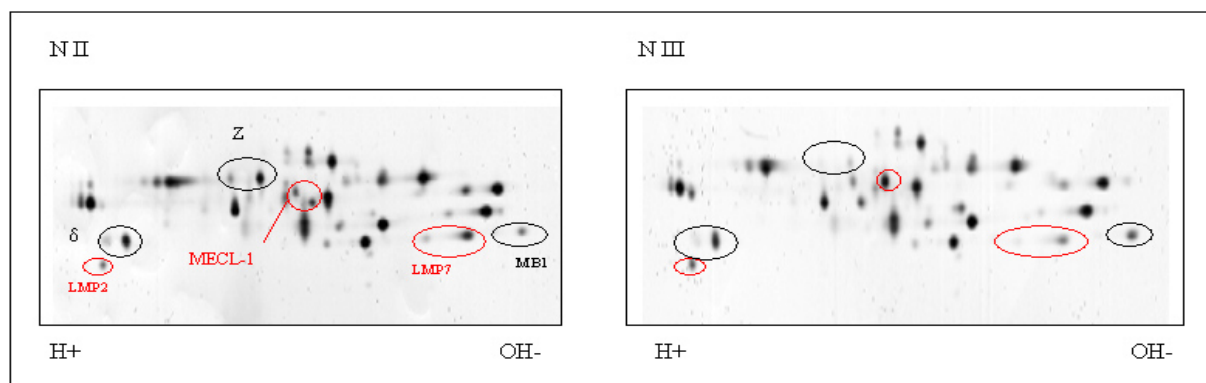
**Abb. 20:** 2D-Pattern der 20S Proteasom-Subtypen CI-CIV aus der cytoplasmatischen Fraktion von HeLaS3-Zellen. Es wurden 5µg (CI) bzw. 8,5µg (CII-CIV) in NEpHGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (angefertigt in Kleingeltechnik von Wagner, MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

In Abb.20 können alle vier cytoplasmatischen Subtypen dem intermediären Typus zugeordnet werden, wobei CI und CII einen verhältnismäßig höheren Anteil an Immuno-Untereinheiten als CIII und CIV. Dies entspricht auch der zuvor bei den induzierten adhärennten Zellen gemachten Beobachtung. Auch bei den microsomalen Subtypen können alle vier dem Intermediär-Typ zugeordnet werden (Abb.21). Der Gehalt an LMP2 nimmt wieder von MI nach MIV hin ab und ist höher als in den cytoplasmatischen 20S Proteasomen. Der Pfeil markiert einen Spot über der



**Abb. 21:** 2D-Pattern der 20S Proteasom-Subtypen MI-MIV aus der microsomalen Fraktion von HeLaS3-Zellen. Es wurden 8µg in NEpHGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (angefertigt in Kleingeltechnik von Wagner, MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

Untereinheit  $\zeta$ , der so intensiv nur in microsomalen Präparationen zu sehen war. Es konnte bisher nicht geklärt werden, um welche Untereinheit es sich hier handelt, es könnte eine Modifikation von  $\zeta$  oder aber auch von C8 ( $\alpha 7$ ) sein. Als strukturellen Unterschied zwischen den meistens 3 Spots der Untereinheit C8 stellten Claverol *et al.* (2002) eine Phosphorylierung an Ser<sup>250</sup> fest, eventuell spielt hier noch eine weitere Modifikation eine Rolle. MECL-1 konnte hier im Gegensatz zu den cytoplasmatischen Subtypen nicht eindeutig lokalisiert werden.



**Abb. 22:** 2D-Pattern der 20S Proteasom-Subtypen NII und NIII aus der nucleären Fraktion von HeLaS3-Zellen (von NI und NIV war nicht genug Material vorhanden). Es wurden 5µg in NEpHGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (angefertigt in Kleingeltechnik von Wagner, MPI für Infektionsbiologie, Berlin).

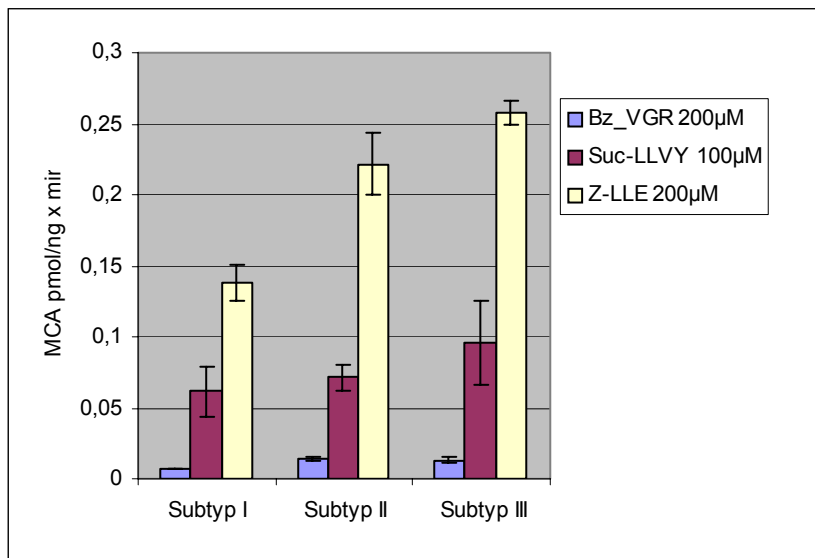
Die nucleären Proteasomen haben einen Anteil am Gesamtproteasom von ca. 2%, deshalb war hier nur von den beiden dominanten Subtypen NII und NIII genügend Material für die NEpHGE vorhanden. Man sieht in Abb.22 deutlich LMP2 und LMP7 in beiden Subtypen. In NII sieht man zwei Spots an den Positionen von MECL-1, die sich in Ladung und Größe unterscheiden. In NIII ist nur ein Spot zu erkennen, dafür ist hier Z nur sehr wenig vorhanden. Aus physiologischer Sicht würde man vermuten, dass in der microsomalen Fraktion der größte Anteil an Immununtereinheiten zu finden ist, da diese Proteasomen mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiert und an der Generierung von

Antigenen und MHC-I-relevanten Epitopen im Rahmen des ERAD (ER associated degradation) beteiligt sind. Dies haben die 2D-PAGE-Analysen bestätigt. Die nucleären Proteasomen sollten aufgrund ihrer Lokalisation hauptsächlich am turnover von Transkriptionsfaktoren und ihrer Regulatoren beteiligt sein. Weiteren Aufschluss über die Funktion der Proteasomen in den einzelnen Zellkompartimenten sollten Aktivitätstests ergeben.

### 3.5 Proteolytische Aktivitäten der einzelnen 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa- bzw. HeLaS3-Zellen

#### 3.5.1 Proteolytische Aktivitäten der uninduzierten HeLa –Zellen

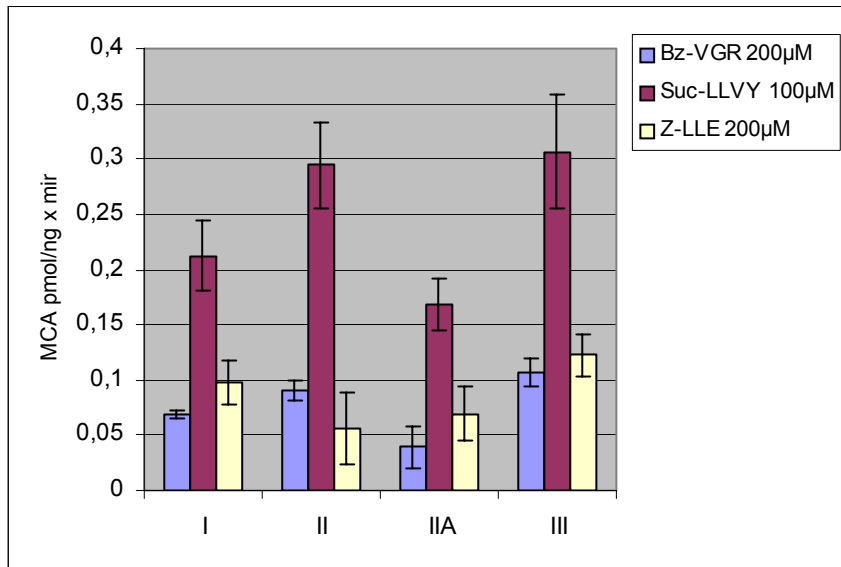
Für die Aktivitätsmessungen wurden fluorogene Peptidsubstrate verwendet, welche mit Methylcumarinamid (MCA) gekoppelt sind (siehe Abschnitt 2.2.5.2., S.27). In den kinetischen Untersuchungen zur Ermittlung des Aktivitätsoptimums wurde eine konstante Menge Proteasom eingesetzt und die Substratmengen variiert. Die Inkubation erfolgte 60 Minuten bei 37°C (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23: Vergleich der spezifischen proteo-lytischen Aktivitäten der 20S Proteasom-Subtypen aus adhären-ten uninduzierten HeLa-Zellen. Die Werte wurden aus fünf un-abhängigen Messungen unter Substratsättigung ermittelt.**

Die drei konstitutiven Subtypen aus adhären-ten uninduzierten HeLa-Zellen zeigten quantitative Unterschiede ihrer katalytischen Aktivitäten gegenüber fluorogenen Peptidsubstraten, während das Verhältnis der drei unterschiedlichen proteolytischen Aktivitäten zueinander bei den einzelnen Subtypen gleich war (Abb.23). In den kinetischen Messungen war zu erkennen, dass das  $v_{max}$  bei ähnlichen Substratkonzentrationen erreicht wurde, was für eine ähnliche  $K_m$ -Werte spricht (Daten nicht gezeigt). Bei allen drei Subtypen war der Substratumsatz bei der PGPH-Aktivität am höchsten und bei der tryptischen Aktivität am geringsten. Subtyp II hat die höchste tryptische und Subtyp III die höchste chymotryptische Aktivität. Subtyp I ist insgesamt weniger aktiv als die beiden anderen. Nach Orlowski & Wilk (2001) werden den Untereinheiten folgende Aktivitäten zugeordnet: Tryptische Aktivität (Spaltung nach basischen Aminosäuren):  $\beta 2$  (Z),  $\beta 2i$  (MECL-1) Chymotryptische Aktivität (Spaltung nach hydrophoben und aromatischen Aminosäuren):  $\beta 5$  (MB1),  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 5i$  (LMP7) PGPH-Aktivität (Spaltung nach sauren Aminosäuren):  $\beta 1$  ( $\delta$ ) Die PGPH-Aktivität ist hier sehr hoch, da die Untereinheit  $\delta$  nicht durch LMP2 ersetzt wird und somit in allen Komplexen zweimal vorhanden ist. Die tryptische Aktivität ist hier Z zuzuschreiben und die chymotryptische Aktivität wird von MB1 ausgeführt.

### 3.5.2 Proteolytische Aktivitäten der $\gamma$ IFN-induzierten adhärennten HeLa-Zellen

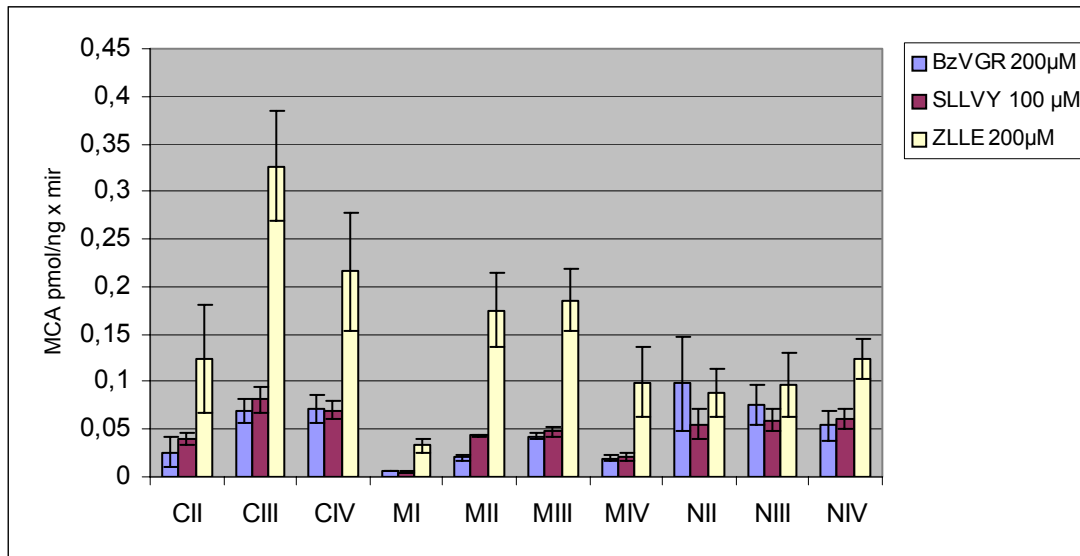


**Abb. 24:** Vergleich der spezifischen proteolytischen Aktivitäten von 20S Proteasom-Subtypen aus adhärennten HeLa-Zellen nach Inkubation mit  $\gamma$ IFN für 144 Stunden. Die Werte wurden aus vier un-abhängigen Messungen unter Substratsättigung ermittelt.

Vergleicht man Abb.24 mit Abb.23 wird deutlich, dass die PGPH-Aktivität der Mischkomplexe nach  $\gamma$ IFN-Induktion geringer ist als bei den 20S Proteasomen aus den uninduzierten HeLa-Zellen. Dafür ist die chymotryptische Aktivität deutlich erhöht. Grund dafür ist der geringere Anteil an  $\delta$ , welches für die PGPH-Aktivität verantwortlich gemacht wird und in den Immuno-Proteasomen zumindest teilweise durch LMP2 ersetzt wird, das wiederum die chymotryptische Aktivität steigert. Außerdem wird in Immuno-Proteasomen noch MB1 durch LMP7 teilweise komplementiert, beide Untereinheiten schneiden nach hydrophoben Aminosäuren, steigern also auch die chymotryptische Aktivität. In Subtyp II und III ist die chymotryptische Aktivität am höchsten, was mit dem Gehalt an LMP7, MB1 und LMP2 korreliert. Auch die tryptische Aktivität der Immuno-Subtypen ist deutlich höher als die der konstitutiven, was eventuell auf das zusätzliche Vorhandensein von MECL1 zurückzuführen ist.

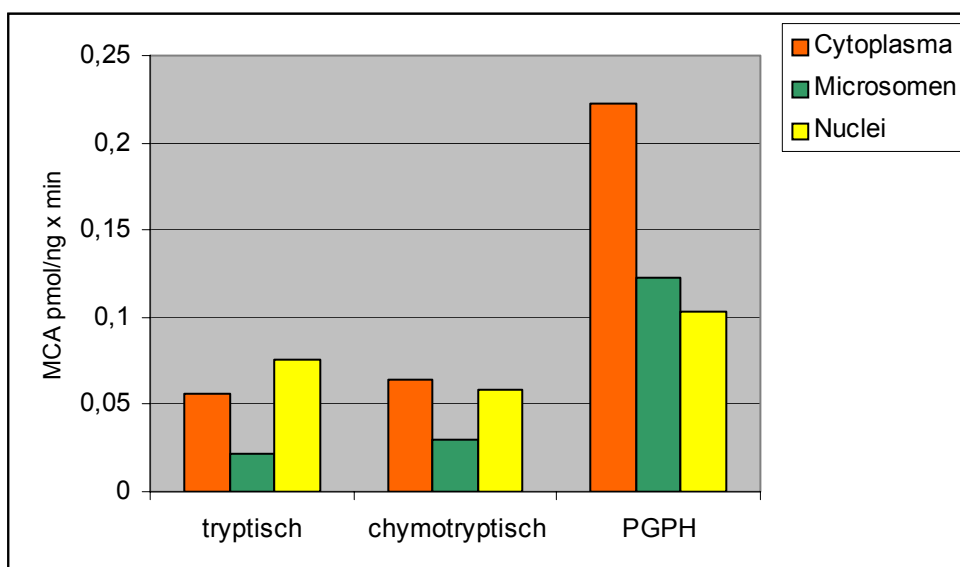
### 3.5.3 Vergleich der proteolytischen Aktivitäten der 20S Proteasomen-Subtypen aus den einzelnen Zellkompartimenten

Die Tests wurden wie vormals mit den fluorogenen Substraten im Vergleich der drei proteolytischen Hauptaktivitäten durchgeführt. Es wurden die einzelnen Subtypen der verschiedenen Zellkompartimente getestet und ihre Aktivitäten miteinander verglichen. Grundlage für die Berechnungen waren drei unabhängige Tests (Abb.25). Die cytoplasmatischen Subtypen haben insgesamt eine etwas höhere Aktivität als die microsomalen. In beiden Fällen ist die PGPH-Aktivität die höchste, was bei den cytoplasmatischen Subtypen mit einem hohen Anteil an  $\delta$  zu erklären ist. Diese Aktivität ist im Subtyp CIII am stärksten ausgeprägt, da hier auch der Gehalt an der komplementären Untereinheit LMP2 am geringsten ist, verglichen mit den anderen cytoplasmatischen Subtypen.



**Abb. 25: Vergleich der spezifischen proteolytischen Aktivitäten von 20S Proteasom-Subtypen aus dem Cytoplasma (C), den Microsomen (M) und den Nuclei (N) von HeLaS3-Zellen. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Messungen unter Substratsättigung ermittelt. Von Subtyp CI und NI konnten wegen der geringen Mengen keine auswertbaren Daten erstellt werden.**

Bei den nucleären Subtypen war die PGPH-Aktivität deutlich geringer, ihr Anteil an LMP2 ist im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt auch höher als in Cytoplasma und Microsomen (vgl. Abb.22 mit Abb.21 und 20). Die tryptische und die chymotryptische Aktivität sind bei den microsomalen Subtypen geringer als bei cytoplasmatischen und nucleären. Die proteolytische Aktivität der microsomalen Proteasom-Subtypen folgt hier allerdings nicht der von Orlowski & Wilk (2001) aufgestellten Hypothese. Bei diesen Proteasomen ist die PGPH-Aktivität zwar nur halb so groß wie bei den cytoplasmatischen Proteasomen-Subtypen, aber immer noch die dominierende Aktivität, obwohl  $\delta$  und LMP2 in etwa gleichen Mengen vorkommen. Nach der Theorie von Orlowski & Wilk (2001) wäre ein Anstieg der chymotryptischen Aktivität zu erwarten gewesen. Die tryptische Aktivität der nucleären Subtypen, assoziiert mit den Untereinheiten Z und MECL-1, ist vergleichbar mit den cytoplasmatischen Subtypen, in NII ist sie allerdings relativ hoch.



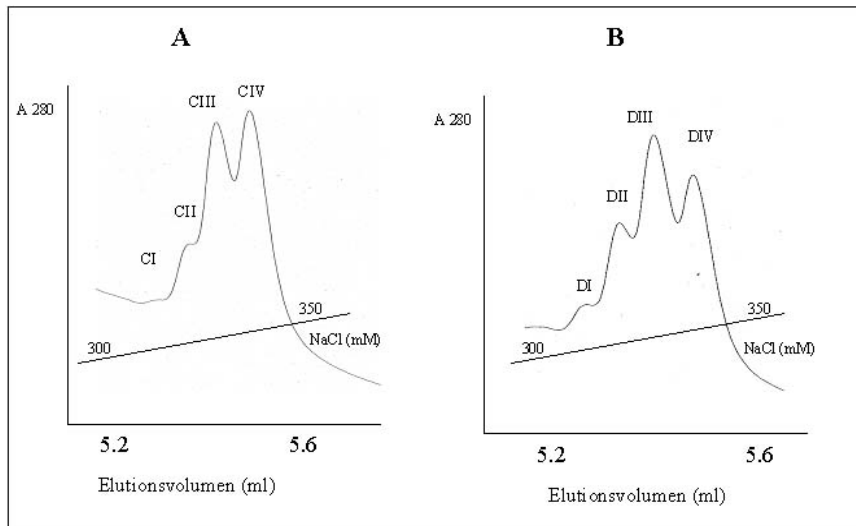
**Abb. 26: Vergleich der proteolytischen Aktivitäten von 20S Proteasom aus den Zellkompartimenten von HeLaS3-Zellen. Berechnung der Mittelwerte aus den Aktivitätsmessungen der einzelnen Subtypen.**

In Abb.26 sind noch einmal die Aktivitäten der 20S Proteasomen aus den Zellkompartimenten insgesamt verglichen. Im Cytoplasma ist die PGPH-Aktivität der Proteasomen ca. doppelt so hoch wie in den beiden anderen Kompartimenten. Bei der tryptischen und chymotryptischen Aktivität sind die microsomalen 20S Proteasomen ca. nur halb so aktiv wie cytoplasmatische und nucleäre.

### **3.6 Untersuchungen zur Glykosylierung von 20S Proteasom aus HeLa- und HeLaS3-Zellen**

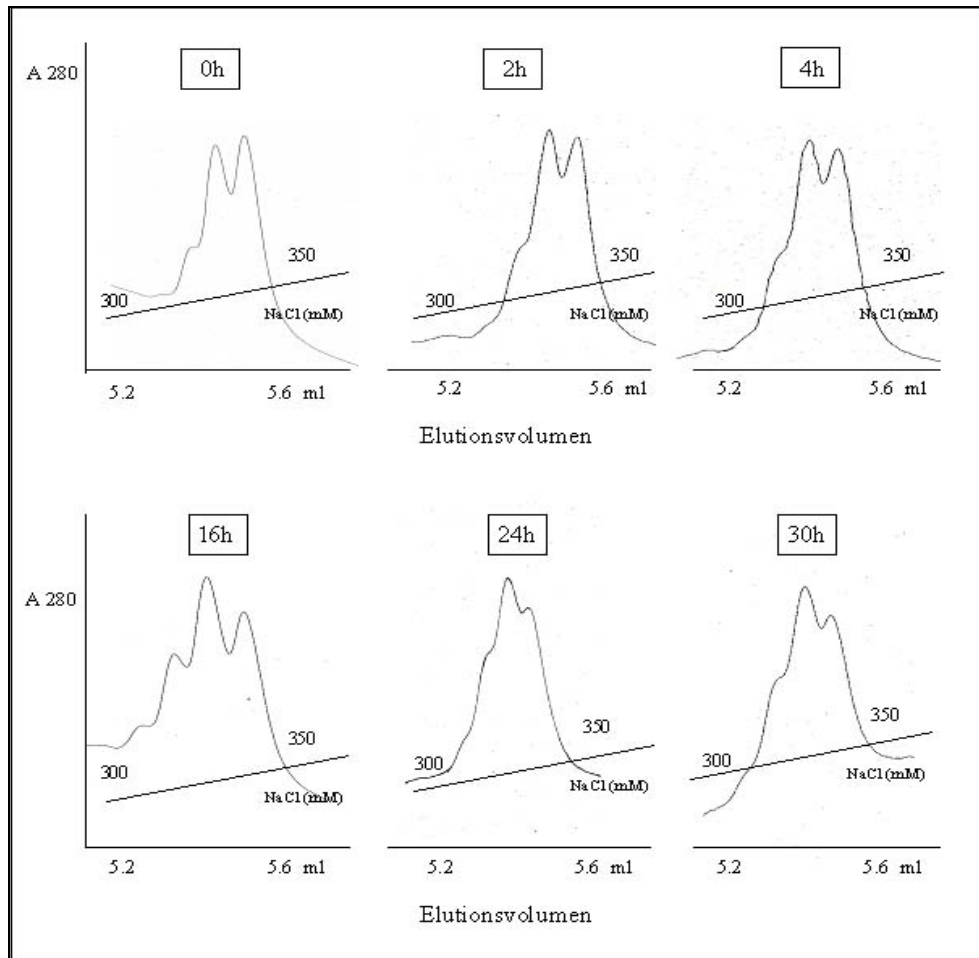
In den vorangegangenen Untersuchungen ergaben sich Hinweise, dass das unterschiedliche Elutionsverhalten von 20S Proteasomen-Subtypen nicht allein durch einen Austausch von Untereinheiten zu erklären ist. Da es sich um Ladungsunterschiede an der Oberfläche des Komplexes handelt, liegt die Vermutung nahe, dass post-translationale Modifikationen der einzelnen Untereinheiten eine Rolle spielen könnten. In einigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Untereinheiten C8 ( $\alpha 7$ ) und C9 ( $\alpha 3$ ) und auch einige Untereinheiten des 19S-Regulators phosphoryliert werden können. Eine Behandlung der Zellen mit  $\gamma$ IFN führte zu einem Absinken der Phosphorylierung, einer Abnahme von 26S Komplexen und zu einem Anstieg von PA28-Proteasom-Komplexen (Bose *et al.*, 2001; Rivett *et al.*, 2001; Bose *et al.*, 2003). Es wurden hier regulatorische Funktionen dieser Modifikation durch Stabilisierung bzw. Destabilisierung der verschiedenen Komplexe vermutet. Post-translationale Modifikationen von Proteasom beschränken sich aber nicht nur auf deren Phosphorylierungen. Hinweise auf eine Glykosylierung von proteasomalen Untereinheiten gab es bereits 1991 von Schliepake *et al.* (1991) in höheren Pflanzen und von Schmid *et al.* (1993) in *Mammalia*. Beide Gruppen testeten 20S Proteasomen mit Lectinen. Schliepake *et al.* erhielten Hinweise auf ein Vorhandensein von Glucosyl-, Mannosyl- und N-Acetylgalactosaminylresten in 20S Untereinheiten. Schmid *et al.* konnten auf einem 2D-Blot von Kalbsleber-20S-Proteasom N-Acetyl-Neuraminsäure, N-Acetylglucosamin und Mannose nachweisen. Neuere Arbeiten von Sümegi *et al.*, 2003 und Zhang *et al.*, 2003, gaben Hinweise auf eine O-gekoppelte Glykosylierung mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc) von Untereinheiten in 20S Proteasom und 19S Regulator in *Drosophila*- bzw. *Mammalia*-Gewebe. Zhang *et al.* (2003) konnten *in vitro* und *in vivo* 26S Proteasom aus dem Kernextrakt von NRK-Zellen inhibieren, indem sie sie mit einer O-GlcNAc-Transferase behandelten, welche proteasomale Untereinheiten glykosylierte. Diese Modifikation bewirkte eine Hemmung der ATPase-Aktivität von 26S Proteasom und somit einen verzögerten Abbau der Transkriptionsfaktoren Sp1 und des hydrophoben Peptidsubstrates Suc-LLVY-MCA. Sie stellten fest, dass nur die Aktivität von 26S- nicht die von 20S-Komplexen mit dieser Methode hemmbar ist. Sümegi *et al.* (2003) zeigten mit dem GlcNAc-spezifischen Lectin Wheat Germ Agglutinin (WGA) und monoclonalen Antikörpern gegen O-gekoppeltes GlcNAc, dass neun Untereinheiten des 20S Proteasoms und fünf Untereinheiten des 19S Regulators aus *Drosophila* positiv reagierten. Aufgrund dieser Ergebnisse war es interessant zu untersuchen, ob evtl. auch Glykosylierungen im 20S Proteasom aus HeLa- bzw. HeLa S3-Zellen nachweisbar sind und eventuell das Subtypen-Pattern beeinflussen. Verdau von 20S Proteasom aus HeLaS3-Zellen mit Neuraminidase. Die Behandlungen von 20S Proteasom mit N-Acetylhexosaminidase (250mU/ml, 37°C, 16 Stunden), PNGaseF (1U/ml, 37°C, 16 Stunden) oder O-Glykosidase (2,5mU/ml, 37°C, 16 Stunden) zeigten keinerlei Veränderungen der Elutions-Muster (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür ist eventuell in der glykosidischen Bindung der vorhandenen Kohlenhydrate zu suchen, die nicht der Spezifität der Enzyme entspricht (siehe unter B:2.4.3.) PNGaseF spaltet N-Glykane vom Proteinrest ab. O-Glykosidase ist spezifisch für O-glykosidisch gebundene Gal- und GalNAc-Reste. N-Acetylhexosaminidase spaltet GlcNAc- und GalNAc-Reste in unterschiedlicher Verknüpfung von Protein- oder Kohlenhydratketten ab. Denkbar wären auch sterische Behinderungen des Enzyms durch die komplexe Struktur des Proteasoms. Nur die Behandlung mit Neuraminidase zeigte einen Effekt. Es wurden cytoplasmatische 20S Proteasomen aus HeLaS3-Zellen mit Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* (50mU/ml, 37°C, 16 Stunden) verdaut. Nach dem Verdau wurde die Probe an MiniQ P3.2/3 chromatographisch aufgetrennt, um zu sehen, ob sich das Muster der Subtypen verändert hat.





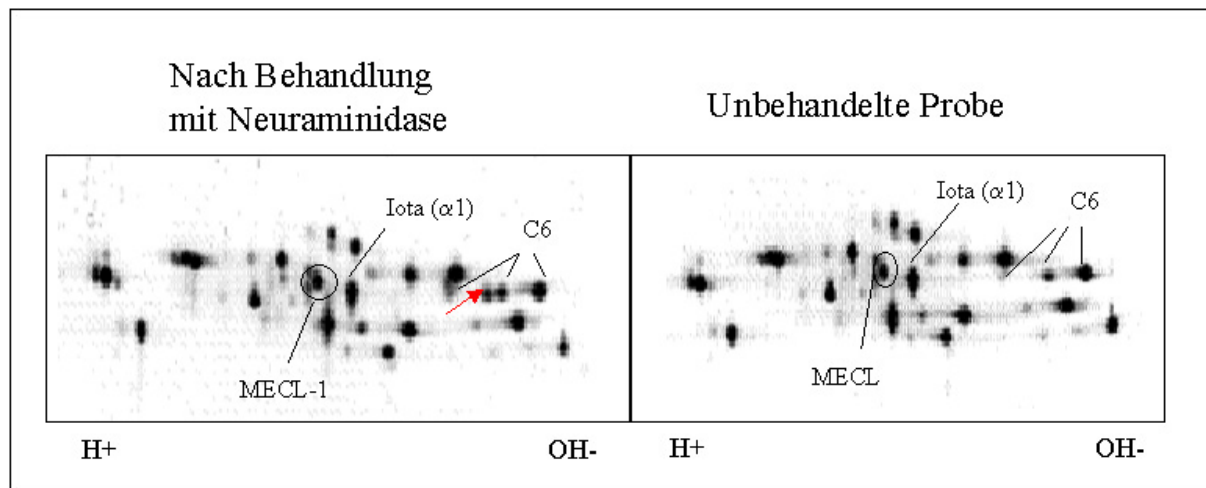
**Abb. 27: 20S Proteasom-Subtypen aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen. Die Auftrennung der Subtypen erfolgte an MiniQ P3.2/3 A: ohne Behandlung und B: nach Behandlung mit Neuraminidase („D“ bedeutet desialyliert). Die Inkubation wurde mit 50mU/ml Neuraminidase und 25µg/ml Proteasom bei 37°C für 16 Stunden durchgeführt.**

In der Abb.27 ist zu sehen, dass der Proteinpeak des Subtyps IV sich verkleinert, während der Proteinpeak der Subtypen I und II deutlich größer werden. Das spricht dafür, dass einige negativ geladene Proteasomen, die in Peak IV eluierten, nach Abtrennen der negativen Ladung der N-Acetyl-Neuraminsäurereste nun früher unter Peak I und II eluieren, so dass der Proteingehalt hier erhöht wird. Denkbar wäre auch eine geringfügige Konformationsänderung einer Untereinheit nach Abspaltung eines oder mehrerer Neuraminsäurereste, so dass sich Ladungsverschiebungen an der Oberfläche des Komplexes ergeben. Die Kontrollprobe in Abb. 27A wurde ohne Neuraminidase unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Eine Wirkung von Proteaseaktivität kann ausgeschlossen werden. Bei der Behandlung von microsomalen 20S Proteasomen in gleicher Weise konnten keine Veränderungen des Elutions-Musters festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Dynamik der enzymatischen Reaktion zu zeigen, erfolgte eine Behandlung von 20S Proteasom mit Neuraminidase in Abhängigkeit von der Zeit.



**Abb. 28: 20S Proteasom-Subtypen aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen. Die Auftrennung der Subtypen erfolgte an MiniQ P3.2/3. Die Inkubationen wurden mit jeweils 50mU/ml Neuraminidase und 25µg/ml Proteasom bei 37°C für 0, 2, 4, 16, 24 und 30 Stunden durchgeführt. Zu jeder Probe wurde ein entsprechender Ansatz ohne Enzym als Blindprobe mit inkubiert. Alle Blindproben zeigten unverändert das Muster wie die Probe „0h“ (nicht dargestellt).**

In Abb.28 kann man die Veränderungen der Subtypen-Pattern in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Neuraminidase verfolgen. Zunächst wird der am meisten negativ geladene Subtyp etwas kleiner wobei noch keine Zunahme der positiveren Subtypen zu beobachten ist. Signifikante Unterschiede sind nach 16 Stunden sichtbar, hier ist die Zunahme der positiveren Peaks deutlich zu sehen. Nach 24 Stunden verändern sich die Mengenverhältnisse nicht mehr wesentlich, allerdings scheint die Trennung schlechter zu erfolgen. Zwischen 24 und 30 Stunden ist kein Unterschied mehr zu erkennen. Damit ist die Dynamik der enzymatischen Reaktion nachgewiesen, es werden negative Ladungen abgespalten, wodurch ein größerer Anteil des Gesamtproteins bei geringeren Salzkonzentrationen eluiert. Da es sich bei den beobachteten Effekten um Ladungsunterschiede handelt, lag die Vermutung nahe, dass evtl. auch im 2D-PAGE-Muster nach der Behandlung mit Neuraminidase einige Untereinheiten bzw. deren modifizierte Varianten ihre Position verändern könnten. In Abb.29 sind die 2D-PAGE-Muster nach NEpHGE-Auftrennung und Silberfärbung gezeigt.



**Abb. 29: NEpHGE-Auftrennung mit Silberfärbung von cytoplasmatischen 20S Proteasom aus HeLaS3-Zellen mit und ohne Behandlung mit Neuraminidase. Es wurden 10µg Proteasom mit 50mU/ml Neuraminidase bei 37°C für 16 Stunden inkubiert.**

Nach Abtrennung einer negativen Ladung, wie z.B. von Sialinsäure, von einer Untereinheit, würde man erwarten, dass sich der isoelektrische Punkt dieser Untereinheit in Richtung Kathode, also mehr in den basischen Bereich verschiebt. In Abb. 29 ist im basischen pH-Bereich nach Neuraminidase-Behandlung ein zusätzlicher Spot (roter Pfeil) zu erkennen. Die Identität dieses Spots konnte bisher nicht geklärt werden. Die Untereinheit mit dem gleichen Molekulargewicht wäre C6 ( $\alpha 4$ ), aber denkbar wären auch Iota ( $\alpha 1$ ) und MECL-1. C6 zeigt meistens drei bis vier Spots in 2D-PAGE-Mustern humaner 20S Proteasomen (Claverol *et al.*, 2002). Es sieht in Abb.29 allerdings so aus, als würde dort die Intensität der stärker sauren, also negativer geladenen Spots zunehmen. Allerdings ist unterschiedliche Anfärbbarkeit mit Silber bei Proteinen hier auch zu beachten. Man kann von der Zunahme der Intensität nicht eindeutig auf eine wirkliche Zunahme der Proteinmenge schließen.

### 3.6.1 Glykannachweis mit Lectinen

Um einen direkten Nachweis der Glykosylierung zu erbringen, sollten Kohlenhydratreste in den Proteasomen nach ihrer 2D-PAGE-Auftrennung und Blot auf PVDF-Membranen mit Lectinen nachgewiesen werden. Es wurden folgende Lectine verwendet:

***Tritrichomonas mobilensis* Lectin (TML):** erkennt spezifisch N-Acylneuraminsäurereste (Neu5Ac, NANA), die  $\alpha 2,3$ - und  $\alpha 2,6$ - gekoppelt sind, dabei N-Glycolylneuraminsäuren mit einer 8fach höheren Affinität als N-Acetylneuraminsäuren.

***Sambucus nigra* Agglutinin I (SNA I):** erkennt N-Acylneuraminsäurereste mit einer  $\alpha 2,6$ -Kopplung an Galactose oder N-Acetyl-Galactosamin (Gal/GalNAc)

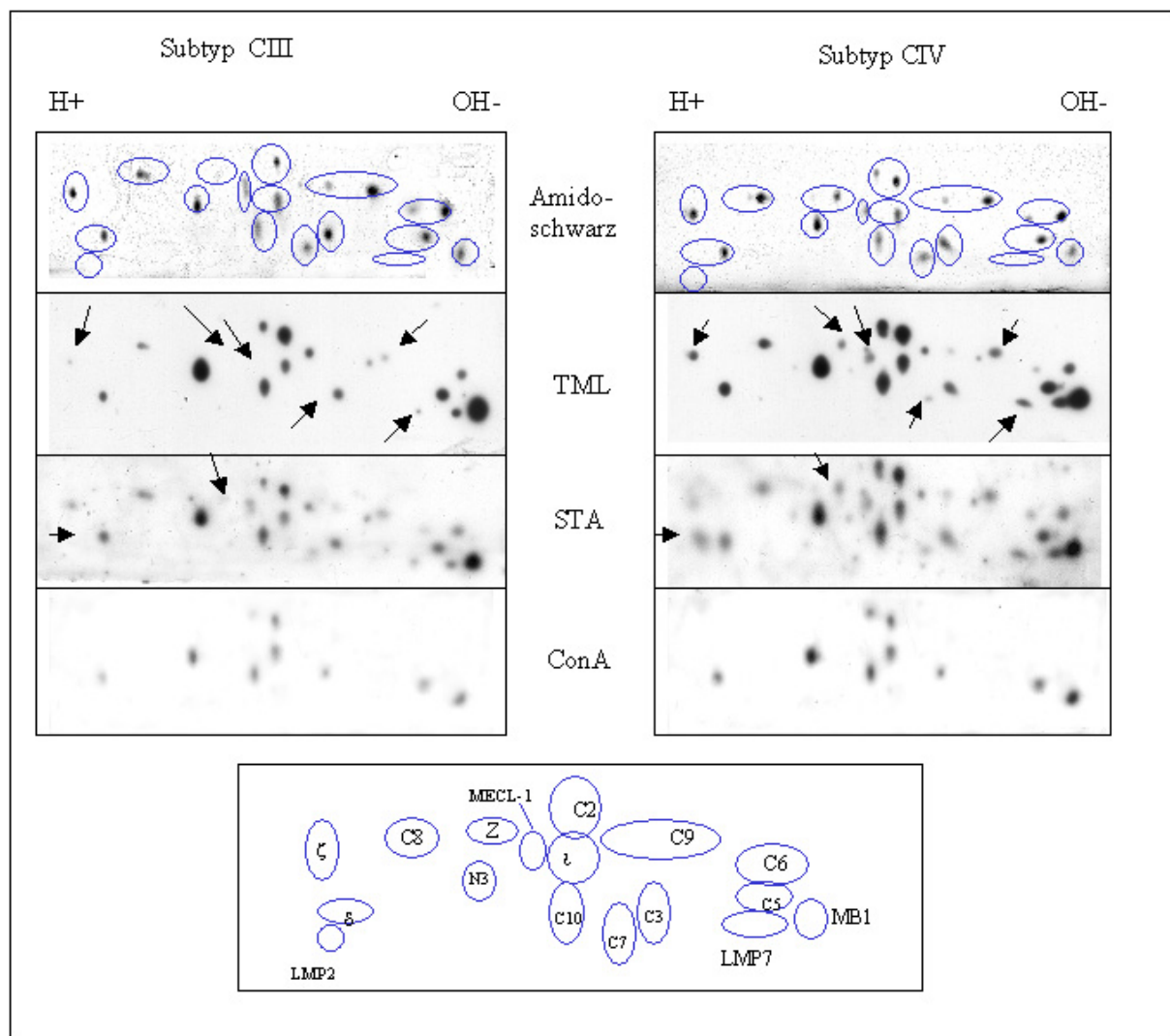
***Solanum tuberosum* Agglutinin (STA):** erkennt Oligomere von N-Acetylglucosamin (GlcNAc), z.B. GlcNAc- $\beta 1,4$ -GlcNAc

***Wheat Germ* Agglutinin (WGA):** erkennt GlcNAc- $\beta 1,4$ -GlcNAc, mit etwas geringerer Affinität auch  $\beta$ -GlcNAc und Neu5Ac

***Concanavalin A* (ConA):** erkennt  $\alpha$ -D-Mannose, verzweigte Mannose-Reste und  $\alpha$ -D-Glucose.

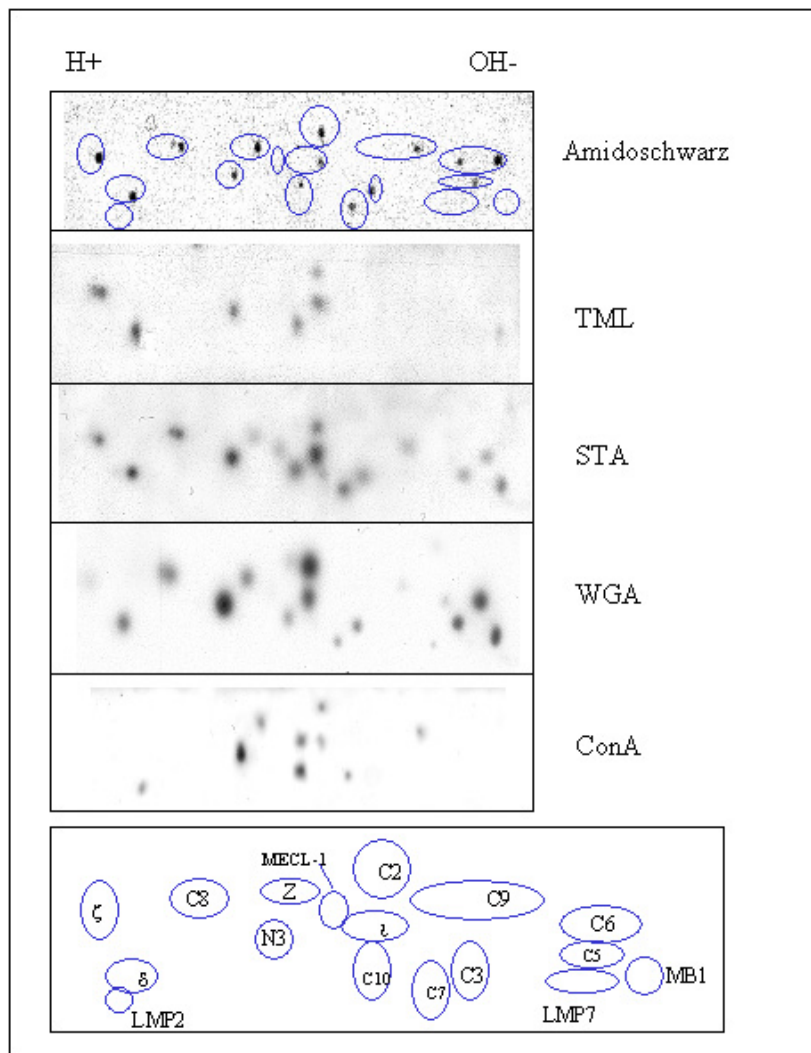
Alle Lectine waren Biotin-gekoppelte Konjugate, der Nachweis erfolgte mit Streptavidin- Peroxidase und ECL-Detektion. Es wurden zunächst zwei cytoplasmatische 20S Proteasom-Subtypen aus HeLaS3-Zellen verglichen. In Abb.30 wurden die cytoplasmatischen 20S Proteasomen-Subtypen CIII und CIV aus HeLaS3-Zellen untersucht. Fast alle Untereinheiten reagierten mit WGA, einige allerdings nur sehr schwach, was auf eine Substitution mit N-Acetylglucosamin (GlcNAc) hinweist. Dies entspricht in etwa auch den von Sümegi *et al.* (2003) gefundenen Daten. Ebenso reagierten fast alle 20S Proteasom-Untereinheiten mit TML, welches spezifisch N-Acetylneuraminsäure (NANA) erkennt. Schmid *et al.* (1993) hatten mit dem Lectin *Limulus polyphemus* Agglutinin (LPA), spezifisch gegen NANA, ein ähnliches Ergebnis. Bei der Färbung mit TML-Biotin fehlen einige Spots bei CIII, die bei CIV angefärbt werden (Pfeile). Es handelt sich hierbei um die Untereinheiten  $\zeta$ , Z, MECL-1, C7 und je eine Unterform von C9 und LMP7. Bei der STA-Biotin-Färbung ist ein Spot von  $\delta$  und ein Spot von Z bei CIV deutlich stärker angefärbt (Pfeile). Die Färbung mit ConA zeigt bei beiden Subtypen die

gleichen Untereinheiten, ist bei CIV aber etwas intensiver als bei CIII. Dies entspricht dem erwarteten Bild, dass der negativer geladene Subtyp CIV auch den höheren Anteil an Kohlenhydrat-Resten besitzt als der Subtyp CIII. Man sieht auch, dass die Intensität der Proteinfärbung der einzelnen Untereinheiten mit Amidoschwarz nicht in gleicher Weise der Intensität der Lectin-Färbung entspricht. Mit Amidoschwarz schwach gefärbte Untereinheiten zeigen eine sehr intensive Färbung mit den Lectinen und umgekehrt. So z.B. bei MB1 (schwache Proteinfärbung und sehr intensive Lectinfärbung), oder der umgekehrte Fall bei  $\zeta$ . Einige Untereinheiten sind in der Amidoschwarz-Färbung gar nicht zu sehen. Die Reaktion mit TML ließ sich nach einer Behandlung der Membran mit Neuraminidase (50mU/ml, 37°C, 16 Stunden) komplett aufheben (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnte dies ein Hinweis auf eine unterschiedliche Glykosylierung der Subtypen und somit ein Grund für ihre unterschiedliche Oberflächenladung sein. Die Behandlungen der Membranen mit N-Acetylhexosaminidase (250mU/ml, 37°C, 16 Stunden), PNGaseF (1U/ml, 37°C, 16 Stunden) oder O-Glykosidase (2,5mU/ml, 37°C, 16 Stunden) führten nicht zur Unterbindung der Reaktion mit STA bzw. WGA (Daten nicht gezeigt). Wie schon bei der Behandlung von gelöstem 20S Proteasom könnten die Enzyme nicht für die glykosidischen Bindungen der vorliegenden Kohlenhydrate spezifisch sein. Sterische Behinderungen der Enzyme sind bei der denaturierenden Form der Auftrennung nicht denkbar.



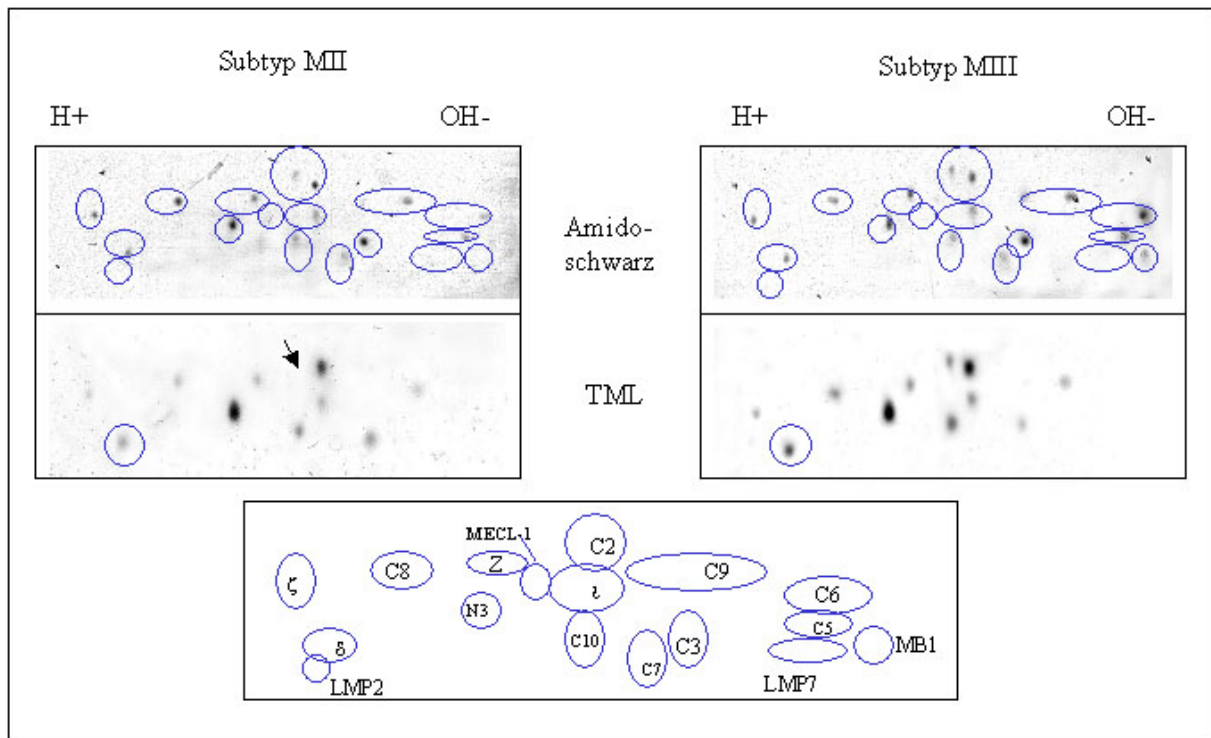
**Abb. 30:** 20S Proteasom der cytoplasmatischen Subtypen CIII und CIV aus HeLaS3-Zellen. Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proben (je 10µg) wurden mit Amidoschwarz, TML-Biotin (erkennt NANA), STA-Biotin (erkennt GlcNAc) und ConA-Biotin (erkennt Mannose und Glucose) angefärbt. Die schwarzen Pfeile markieren Unterschiede zwischen den Subtypen, jeweils verglichen mit der gleichen Nachweis-Methode. Unten im Bild sind schematisch die Positionen der Untereinheiten angegeben.

Als nächstes wurde microsomales 20S Proteasom aus HeLaS3-Zellen in gleicher Weise untersucht (Abb.31). Obwohl eine Behandlung mit Neuraminidase des 20S Proteasoms aus dieser Fraktion keine Veränderungen gezeigt hat, konnten auch hier mit Lectinen Kohlenhydrat-Reste nachgewiesen werden. In Abb.31 fällt im Vergleich zu Abb.30 auf, dass mit TML deutlich weniger Untereinheiten bei den microsomalen als bei den cytoplasmatischen 20S Proteasomen angefärbt werden. Die beiden GlcNAc-erkennenden Lectine STA und WGA zeigen dagegen wieder fast das komplette Untereinheiten-Muster wie bei den cytoplasmatischen Proben, allerdings mit einer deutlich unterschiedlichen Intensität der einzelnen Untereinheiten. In der Amidoschwarz-Färbung sind auch hier nicht alle Untereinheiten zu erkennen, ihre Position ist schematisch markiert. Das Lectin WGA bindet außer an GlcNAc-Reste auch mit geringerer Affinität an NANA-Reste und wurde als Kontrolle zu TML und STA, das GlcNAc-Oligomere bindet, eingesetzt. Das Muster der WGA-Reaktion entspricht im Wesentlichen dem der STA-Reaktion, allerdings sind einige Untereinheiten intensiver gefärbt (N3, Z, C2), und  $\zeta$  ist sehr viel schwächer mit WGA als mit STA gefärbt. Möglicherweise handelt es sich hier um Unterschiede in der glykosidischen Verknüpfung der Kohlenhydrate, WGA erkennt mit höherer Affinität GlcNAc - $\beta$ 1,4-GlcNAc-Disaccharide als andere Oligosaccharide, STA ist weniger spezifisch. Die Untereinheiten C2, N3 und  $\iota$  sind außerdem auch mit NANA-Resten substituiert, da sie mit TML reagieren, das könnte ihre verstärkte Anfärbung mit WGA ebenfalls erklären. Die Färbungen mit ConA und TML zeigen ein ähnliches Muster. Auch hier ist N3 am intensivsten gefärbt.



**Abb. 31:** 20S Proteasom der microsomalen Fraktion aus HeLaS3-Zellen. Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proben (je 10µg) wurden mit Amido-schwarz, TML-Biotin (erkennt NANA), STA-Biotin (erkennt GlcNAc) und ConA-Biotin (erkennt Mannose und Galaktose) angefärbt. Unten im Bild sind schematisch die Positionen der Untereinheiten angegeben. Es wurden daraufhin die microsomalen 20S Proteasom-Subtypen MII und MIII untersucht (Abb.32).

Wegen des geringen zur Verfügung stehenden Materials konnte hier nur die Reaktion mit TML der zwei Subtypen MII und MIII verglichen werden.

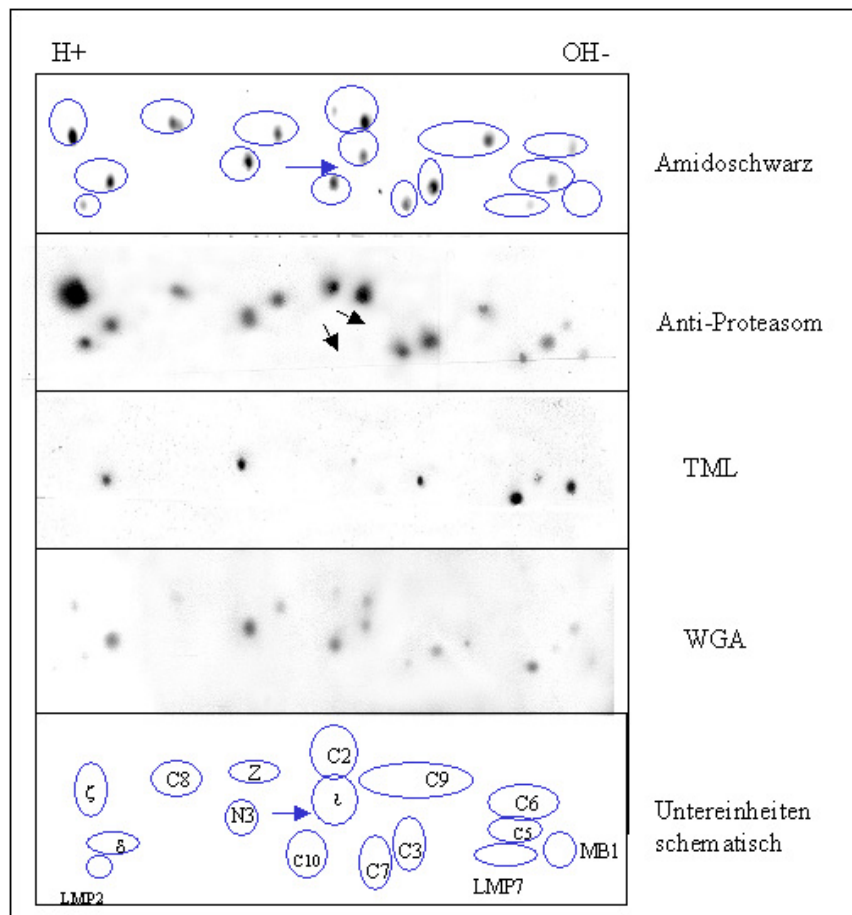


**Abb. 32: 20S Proteasom-Subtypen MII und MIII der microsomalen Fraktion aus HeLaS3-Zellen.** Die auf PVDF-Membranen geblotteten Proben (je 10 $\mu$ g) wurden mit Amidoschwarz, TML-Biotin (erkennt NANA) angefärbt. Unten im Bild sind schematisch die Positionen der Untereinheiten angegeben.

Die TML-Reaktion bei Subtyp MIII ist intensiver als bei Subtyp MII, sehr deutlich ist das beim Vergleich der Untereinheit  $\delta$  sichtbar (Markierung). Ein Spot von C2 fehlt bei der TML-Färbung in MII völlig (Pfeil). Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der negativer geladene Subtyp MIII offensichtlich mehr NANA enthält als der positiver geladene MII.

Um die Glykosylierung von 20S Proteasom auch in adhären wachsenden HeLa-Zellen beurteilen zu können, wurde cytoplasmatisches 20S Proteasom aus HeLa-Zellen in NEpHGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet (in Kleingeltechnik von Wagner, MPI für Infektionsbiologie, Berlin). Es wurden die Zellen nach 144 stündiger Inkubation mit  $\gamma$ IFN ausgewählt, um auch die Immuno-Untereinheiten untersuchen zu können (Abb. 33).





**Abb. 33: 20S Proteasom der aus HeLa-Zellen (144 Stunden mit 20U/ml  $\gamma$ IFN inkubiert). Die auf PVDF-Membranen geblotteten Probe (je 10 $\mu$ g) wurde mit Amidoschwarz, Antiproteasom-Antikörper, TML-Biotin (erkennt NANA), WGA-Biotin (erkennt GlcNAc) angefärbt. Unten im Bild sind schematisch die Positionen der Untereinheiten angegeben. Beim Westernblot mit dem Antiproteasom-Antikörper (Nr. 67 gegen humanes 20S Proteasom) fehlen die Untereinheiten 1 und C10 (schwarze Pfeile). Die Position von MECL-1 ist mit einem blauen Pfeil markiert.**

In Abb.33 fällt auf, dass TML im Gegensatz zu den Proben aus HeLaS3-Zellen nur an sechs Untereinheiten bindet:  $\delta$ , N3, C3, LMP7, C5 und MB1. Die Zuordnung der Untereinheiten erfolgte jeweils mit den entsprechenden Antikörpern auf derselben Membran (Daten nicht gezeigt). Mit WGA reagieren wieder fast alle Untereinheiten, aber auch deutlich schwächer als bei den HeLaS3-Zellen. Bis auf MB1 sind die mit TML positiven Untereinheiten auch mit WGA intensiver gefärbt. Auch WGA reagiert in geringem Maße mit NANA. Zwischen der Behandlung mit TML und WGA wurde die Membran mit Neuraminidase (50mU/ml, 37°C, 16 Stunden) inkubiert, worauf eine erneute Reaktion mit TML nicht möglich war. Es scheint so, dass die 20S Proteasomen aus HeLa-Zellen geringer glykosyliert sind als die aus HeLaS3-Zellen. Denkbar wäre hier allerdings ein Effekt durch die Langzeit-Inkubation mit  $\gamma$ IFN, da auch die Vitalität der Zellen unter diesen Bedingungen beeinträchtigt war. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst.

**Tab. 5: Reaktion der 20S Proteasom-Untereinheiten aus HeLaS3 Cytoplasma, HeLaS3 Microsomen und HeLa Cytoplasma (20U/ml  $\gamma$ IFN, 144h) mit den Lectinen TML (erkennt NANA) und STA bzw. WGA (erkennen GlcNAc). Ausgewertet wurden die 2D-Bilder aus den Abb. 25, 26, 27 und 28. (starke Intensität des Spots ++ ; Spot deutlich sichtbar + ; Spot nur sehr schwach sichtbar (+) ; Spot nicht sichtbar -)**

Untereinheit	NANA/ HeLaS3 Cyt.	NANA/ HeLaS3 Mic.	NANA/ HeLa $\gamma$ IFN	GlcNAc/ HeLaS3 Cyt.	GlcNAc/ HeLaS3 Mic.	GlcNAc/ HeLa $\gamma$ IFN	Man/ HeLaS3 Cyt.	Man/ HeLaS3 Mic.
$\alpha$ 1 ( $\iota$ )	+	+	-	+	++	+	+	+
$\alpha$ 2 (C3)	+	(+)	+	+	+	+	-	-
$\alpha$ 3 (C9)	+	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-
$\alpha$ 4 (C6)	+	-	-	+	+	(+)	-	-
$\alpha$ 5 ( $\zeta$ )	+	+	-	(+)	+	(+)	-	-
$\alpha$ 6 (C2)	++	++	-	++	++	(+)	+	+
$\alpha$ 7 (C8)	+	(+)	-	+	+	(+)	-	-
$\beta$ 1 ( $\delta$ )	+	+	+	+	+	+	+	+
i $\beta$ 1 (LMP2)	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ 2 (Z)	(+)	(+)	-	(+)	+	+	-	-
i $\beta$ 2 (MECL-1)	(+)	-	-	-	(+)	-	-	-
$\beta$ 3 (C10)	+	+	-	+	+	+	+	+
$\beta$ 4 (C7)	(+)	-	-	(+)	+	(+)	+	+
$\beta$ 5 (MB1)	++	-	+	++	+	-	+	-
i $\beta$ 5 (LMP7)	+	-	+	+	(+)	+	-	-
$\beta$ 6 (C5)	+	-	(+)	+	+	(+)	+	-
$\beta$ 7 (N3)	++	++	+	++	++	++	+	+

Die cytoplasmatischen 20S Proteasom-Subtypen scheinen stärker glykosyliert zu sein als die microsomalen. Die Untereinheiten N3 und  $\delta$  reagieren bei allen Proben mit den verschiedenen Lectinen, N3 zum Teil sehr stark. Auch  $\iota$ , C2 und C10 reagieren bis auf eine Ausnahme (TML bei HeLa  $\gamma$ IFN) mit allen verwendeten Lectinen. LMP2 und MECL-1 hingegen zeigen in allen Proben keine (bzw. MECL-1 in zwei Fällen eine sehr schwache) Reaktion. Alle Untereinheiten, die NANA enthalten, zeigten auch mit GlcNAc-spezifischen Lectinen eine Reaktion, allerdings nicht mit dem Mannose-spezifischen ConA.

### 3.6.2 Chemischer Nachweis von Kohlenhydraten in 20S Proteasom

#### 3.6.2.1 Nachweis der neutralen Monosaccharide

Die positive Reaktion der Lectine mit proteasomalen Untereinheiten gibt einen Hinweis auf das



Vorhandensein von Kohlenhydrat-Resten und darauf, um welche Kohlenhydrate es sich handeln könnte. Über die Menge an Oligosacchariden kann man keine Aussage machen. Deshalb sollte ein chemischer Nachweis der Monosaccharide in 20S Proteasom Aufschluß darüber geben. Die Analysen wurden von Grunow und Zimmermann-Kordmann, Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Charité, Campus Benjamin Franklin, durchgeführt. Die Kohlenhydrat-Reste wurden durch saure Hydrolyse vom Protein abgetrennt und die Analytik erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie (HPLC) mit gepulster amperometrischer Detektion. Es wurden cytoplasmatische (30 bzw. 110µg) und microsomale (20µg) 20S Proteasomen aus HeLaS3-Zellen untersucht (Tabelle 6).

**Tab. 6: Monosaccharidanalyse von cytoplasmatischen und microsomalen 20S Proteasom. Die Angaben erfolgten in pmol Monosaccharid / µg Protein. Monosaccharide: Fucose (Fuc), N-Acetyl-Galaktosamin (GalNAc), N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc), Galaktose (Gal), Glucose (Glc), Mannose (Man).**

Probe	Fuc	GalNAc	GlcNAc	Gal	Glc	Man
cyt. 20S 110µg 169 pmol	0	0,36 pmol/µg 0,234 pmol/pmol Proteasom	0,709 pmol/µg  0,46 pmol/pmol Proteasom	1,35 pmol/µg  0,879 pmol/pmol Proteasom	7,3 pmol/µg  4,75 pmol/pmol Proteasom	2,6 pmol/µg  1,69 pmol/pmol Proteasom
cyt. 20S 30µg  46,6 pmol	0,16 pmol/µg  0,107 pmol/pmol Proteasom	0,4 pmol/mg  0,26 pmol/pmol Proteasom	0	0,33 pmol/µg  0,212 pmol/pmol Proteasom	2,7 pmol/µg  1,74 pmol/pmol Proteasom	4,8 pmol/µg  3,09 pmol/pmol Proteasom
mic. 20S 20µg  30,7 pmol	0,3 pmol/µg 0,195 pmol/pmol Proteasom	0,65 pmol/µg  0,423 pmol/pmol Proteasom	0,3 pmol/µg  0,195 pmol/pmol Proteasom	2,45 pmol/µg  1,59 pmol/pmol Proteasom	12,65 pmol/µg  8,24 pmol/pmol Proteasom	18,15 pmol/µg  10,73 pmol/pmol Proteasom

Von dem microsomalen 20S Proteasom war nur eine Analyse möglich, von dem cytoplasmatischen 20S Proteasom standen zwei Proben unterschiedlicher Menge zur Verfügung. Die Werte weisen zum Teil große Unterschiede auf, was daran liegt, dass die Methode bei den geringen Protein- und Kohlenhydratmengen an der Nachweisgrenze war. Die Messung von Glucose und Mannose zeigt oft überhöhte Werte aufgrund von Verunreinigungen aus der Umgebung. Die Retentionszeit von Mannose ist ausserdem mit der von Xylose identisch, so dass auch hier Überlagerungen auftreten können. Auffällig ist der hohe Gehalt an Mannose und Glucose in den microsomalen Proteasomen. Dies entspricht nicht den Erwartungen nach den Ergebnissen der Blots mit ConA, die schwächer gefärbt waren als die mit TML. Die Lectinuntersuchungen gaben auch einen Hinweis auf GlcNAc-Vorkommen, was zumindest in zwei Proben bestätigt wurde.

### 3.6.2.2 Nachweis der Neuraminsäuren

Auch diese Analyse wurde von D. Grunow und M. Zimmermann-Kordmann, Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Charité, Campus Benjamin Franklin, durchgeführt. Die Neuraminsäuren  $\alpha$ -N-Acetyl-Neuraminsäure und  $\alpha$ -N-Glycolyl-Neuraminsäure wurden mittels milder saurer Hydrolyse von den Proteinresten abgetrennt und dann über Anionenaustausch-Chromatographie (HPLC) mit gepulster amperometrischer Detektion nachgewiesen. Es konnte bisher nur 20S Proteasom aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen untersucht werden. Es wurden mehrere

Auftragungen aus einer Probe vorgenommen und Mittelwerte errechnet (Tabelle 7).

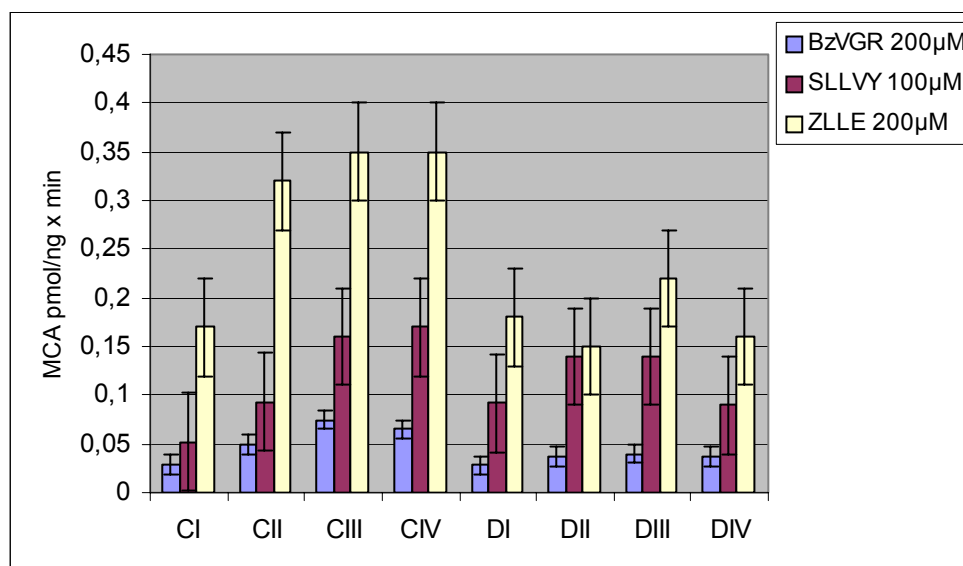
**Tab. 7: Neuraminsäureanalyse von 20S Proteasom aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen, Angabe in pmol/µg Protein.**

Probe	Neu5Gc	Neu5Ac
cyt. 20S aus HeLaS3 (30µg), entspricht 46,6 pmol	0,04 pmol/µg oder 0,025 pmol/pmol Proteasom	0,024 pmol/µg oder 0,015 pmol/pmol Proteasom

Die Mengen an Neuraminsäure sind sehr viel geringer als die für die anderen Kohlenhydrat-Reste ermittelten Werte. Dies entspricht nicht dem Bild, das aus den Untersuchungen mit TML erhalten wurde. Bei den cytoplasmatischen Proben reagierten fast alle Untereinheiten mit TML, einige sehr stark. Das Lectin TML gilt als sehr spezifisch für Neu5Ac und Neu5Glc, so dass Kreuzreaktionen mit anderen Kohlenhydraten unwahrscheinlich sind. Aus den vorangegangenen Versuchen lässt sich schließen, dass die Intensität der Lectinbindung offensichtlich nicht mit der Menge an Kohlenhydrat korreliert.

### 3.6.3 Proteolytische Aktivität von cytoplasmatischen 20S Proteasom-Subtypen nach Desialylierung

Um einen eventuellen Einfluß der Sialylierung auf die proteolytische Aktivität von 20S Proteasom zu untersuchen, wurden mit 20S Proteasom-Subtypen und 20S Proteasom-Subtypen nach Neuraminidase-Behandlung aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten durchgeführt. Bisher ergaben aber erst zwei unabhängige Tests auswertbare Ergebnisse (Abb.34).



**Abb. 34: Vergleich der spezifischen proteolytischen Aktivitäten von 20S Proteasom-Subtypen aus dem Cytoplasma von HeLaS3-Zellen ohne (C) und nach Neuraminidase-Behandlung (D) mit 50mU/ml bei 37°C für 16 Stunden.**

Anhand der Testergebnisse in Abb.34 ist zu vermuten, dass durch die Desialylierung am stärksten die PGPH-Aktivität beeinflusst wurde, sie war bei den Subtypen DII-DIII fast nur noch halb so hoch wie bei der unbehandelten Kontrolle. Die deutlichsten Unterschiede sind zwischen den Subtypen DIII und

DIV im Vergleich mit den Subtypen CIII und CIV zu verzeichnen. Dies würde bedeuten, dass hier die Desialylierung zu einem Verlust an Aktivität führt. Die tryptische Aktivität ist bei DIII und DIV nur noch halb so groß wie bei CIII und CIV, während die der Subtypen DI/II nicht wesentlich geringer ist als die von CI/II. Die chymotryptische Aktivität ist in DIV um etwa die Hälfte geringer als im Subtyp CIV, bei den Subtypen DI/II ist eher ein Anstieg im Vergleich zu CI/II zu beobachten. Die größten Veränderungen der Aktivitäten sind wie erwartet in den mehr negativ geladenen Subtypen DIII und DIV zu verzeichnen. Nach diesen Daten scheint es so, als würde die Spaltung nach sauren Aminosäuren, die im Wesentlichen durch die Untereinheit  $\delta$  erfolgt, nach Desialylierung schlechter vonstatten gehen. Auch die Spaltung nach basischen Aminosäuren scheint erschwert zu sein. Am wenigsten beeinflusst wird hiernach die Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren. Es müssten dahingehend aber noch weitere Tests folgen, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Um Aussagen über die Bedeutung der Glykosylierung auf die Funktion des 20S Proteasoms machen zu können, wären hier auch Tests mit längeren Peptidsubstraten interessant.

## 4 Diskussion

### 4.1 20S Proteasom-Subtypen aus Einzelzellen unterscheiden sich strukturell und funktionell voneinander

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die 20S Proteasomen aus T2-Zellen und aus HeLa-Zellen auf ihre Subtypen hin untersucht. Es zeigte sich, dass zwei bzw. drei Subtypen trennbar waren, obwohl in diesen Zellen ausschließlich konstitutive Proteasomen exprimiert werden. Dies war ein eindeutiger Hinweis darauf, dass das Vorhandensein verschiedener Subtypen nicht nur auf den Austausch der  $\beta$ -Untereinheiten zurückzuführen ist, sondern dass hier offensichtlich noch andere Modifikationen vorliegen, die zu Ladungsunterschieden an der Oberfläche der Komplexe führen. In zweidimensionalen Auftrennungen von 20S Proteasom wurde in dieser und anderen Arbeiten (u.a. Kristensen *et al.*, 1994; Hendil *et al.*, 1995) eine Heterogenität der proteasomalen Untereinheiten festgestellt. Claverol *et al.*, 2002 fanden, dass fast alle der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von mehreren Spots mit verschiedenen pI-Werten repräsentiert wurden. Auch hier sind als Ursache post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, N-Acetylierung, Alkylierung und oxidative Veränderungen denkbar. Für die Untereinheiten C8 und C9 sind Phosphorylierungen beschrieben (Bose *et al.*, 2001; Rivett *et al.*, 2001; Claverol *et al.*, 2002). Möglicherweise unterscheiden sich die 20S Proteasom-Subtypen in HeLa-Zellen im Hinblick auf die Mengenverteilung dieser modifizierten Untereinheiten voneinander, Vergleiche der 2D-PAGE-Muster der einzelnen Subtypen von induzierten HeLa- bzw. HeLaS3-Zellen miteinander stützten diese Hypothese (siehe Abbildungen 10, 12, 20, 21 und 22). Ein endgültiger Beweis konnte aber noch nicht erbracht werden. Bei allen drei 20S Proteasom Subtypen aus HeLa-Zellen zeigte sich beim Vergleich der proteolytischen Aktivitäten die Verteilung folgendermaßen: PGPH > chymotryptisch > tryptisch (Abb.23). Die Messungen erfolgten mit fluorogenen Peptidsubstraten mit einer Länge von drei bis vier Aminosäuren, die unabhängig von Ubiquitinierung und aktivem Transport bzw. Entfaltung durch den 19S bzw. 11S Regulator-Komplex von dem 20S Proteasom gespalten wurden. Auch bei den Untersuchungen von Khan *et al.* (2001) und Dahlmann *et al.* (2000) war die Verteilung der spezifischen Aktivitäten mit den Substraten Z-LLE-MCA (bzw. Z-LLE- $\beta$ NA), Suc-LLVY-MCA und Bz-VGR-MCA wie oben beschrieben. Die Umsatzrate und -geschwindigkeit der fluorogenen Substrate hängt von ihren chemischen Eigenschaften und den Bedingungen im Test ab. Das hydrophobe Substrat Suc-LLVY-MCA für die Messung der chymotryptischen Aktivität wird wesentlich schneller in Anwesenheit von SDS, Phospholipiden oder Fettsäuren umgesetzt. Ähnlich verhält es sich mit dem Umsatz des Substrates Z-LLE-MCA für die PGPH-Aktivität, hier wirkt die Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ -Ionen zusätzlich aktivitätssteigernd. Für die PGPH-Aktivität wurde auch das Vorhandensein von zwei kinetisch verschiedenen Aktivitäten berichtet, welche sich durch allosterische Effekte positiv beeinflussen und zu einer sigmoidalen Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration führen. Es werden auch Bindungseffekte von benachbarten, katalytisch inaktiven Untereinheiten diskutiert (Djaballah *et al.*, 1992 bzw. 1993). Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass die proteolytischen Aktivitäten von bestimmten  $\beta$ -Untereinheiten ausgeführt werden und dass diese unterschiedlich in ihrer Reaktion auf spezifische Inhibitoren und Effektoren sind, obwohl ihr katalytischer Mechanismus derselbe ist (Orlowski & Wilk, 2001). In der Arbeit von Dahlmann *et al.* (2000) wurden die 20S Proteasom-Subtypen aus dem Skelettmuskel der Ratte in Aktivitätstests verglichen. Die drei konstitutiven Subtypen unterschieden sich in ihren  $v_{max}$ - und  $K_m$ -Werten sowohl untereinander, als auch von den intermediären und Immuno-Subtypen. Der Unterschied zwischen konstitutiven, intermediären und Immuno-Subtypen im Hinblick auf die proteolytischen Aktivitäten ist in erster Linie durch den Austausch der katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten zu erklären. Aktivitätsunterschiede von Subtypen mit der gleichen Zusammensetzung von aktiven  $\beta$ -Untereinheiten könnten mit sterischen und ladungsbedingten Effekten und Konformationsänderungen durch Modifikationen an benachbarten Untereinheiten der katalytischen Zentren erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit waren bei den rein konstitutiven 20S Proteasom-Subtypen aus adhärennten HeLa-Zellen Unterschiede zu erkennen. Die PGPH-Aktivität und die tryptische Aktivität von Subtyp III waren doppelt so hoch wie die von Subtyp I, die chymotryptische Aktivität war ca. 1,5fach erhöht (Abb.23).

## 4.2 Einfluß von $\gamma$ IFN und Bildung von 20S Proteasomen-Mischkomplexen führt zu einer Änderung des Subtypen-Musters und der proteolytischen Aktivitäten.

Wurden die HeLa-Zellen in Anwesenheit von  $\gamma$ IFN inkubiert, änderte sich das Muster und die Untereinheiten-Zusammensetzung der 20S Proteasom-Subtypen signifikant. Es entstanden hauptsächlich Intermediär-Subtypen, die sowohl Immuno- als auch konstitutive Untereinheiten aufweisen. Die Veränderungen zeigen eine zeitliche Dynamik und auch nach 144 Stunden  $\gamma$ IFN-Inkubation weit über die Halblebenszeit der konstitutiven 20S Proteasomen in HeLa-Zellen (54 Stunden, Information von Heink) hinaus, sind noch konstitutive Untereinheiten in den 20S Komplexen nachweisbar. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Verteilung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten in den 20S Proteasom-Subtypen aus  $\gamma$ IFN-induzierten HeLa-Zellen. Die Lokalisation von MECL-1 ist schwierig, weil die Position zum Teil nicht eindeutig mit dem spezifischen Antikörper bestimmt werden konnte, da dieser oft Kreuzreaktionen mit anderen Untereinheiten, vor allem mit Z, zeigt. Um die Intensitäten der einzelnen Spots bestimmter Untereinheiten und ihrer modifizierten Varianten vergleichen zu können, müssten sehr viel mehr 2D-PAGE-Bilder der Subtypen angefertigt werden, damit eine statistische Auswertung möglich ist.

**Tab. 8: Verteilung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten in den 20S Proteasom-Subtypen aus HeLa-Zellen, 72 h bzw. 144 h mit  $\gamma$ IFN inkubiert . (Auswertung der 2D-PAGE, optische Intensität: ++ stark; + gut sichtbar; (+) schwach).**

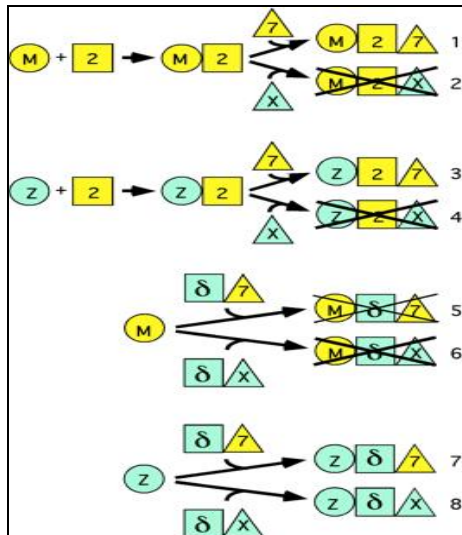
Subtyp Unter- einheit	II (72 h)	IIA (72 h)	III (72 h)	I (144 h)	II (144 h)	III (144 h)
$\delta$	+	++	+	+	+	+
MB1	+	(+)	++	+	(+)	+
Z	+	++	++	+	+	+
LMP2	(+)	+	-	+	+	-
LMP7	+	++	+	+	+	+
MECL-1	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)

Griffin *et al.* (1998) zeigten in ihren Experimenten einen kooperativen Einbau von Immuno-Untereinheiten in transfizierten T2-Zellen und schlussfolgerten daraus, dass in erster Linie reine Immuno- oder reine konstitutive 20S Komplexe entstehen und dass Mischkomplexe nur auf eher untergeordneten Nebenwegen gebildet werden. Khan *et al.* (2001) beschreiben in ihren Experimenten mit viral infizierten Mäusen eine maximale Reduktion der konstitutiven  $\beta$ -Untereinheiten MB1 um das achtfache und  $\delta$  um das vierfache (die Verdrängung von Z durch MECL-1 wird mit 50% angegeben). Dies geschieht nach 8 Tagen in der Hochphase der Infektion, wenn der Virustiter beginnt abzunehmen und die Expansion der spezifischen CD8<sup>+</sup> -T-Zellen am größten ist. Danach nimmt der Anteil der konstitutiven Untereinheiten wieder zu, der der Immuno-Untereinheiten entsprechend ab. Hier wurde von einer Halblebenszeit von 12-15 Tagen der konstitutiven 20S Proteasomen in Rattenleber ausgegangen. Die Autoren sprechen von einem nahezu kompletten Austausch von 20S Proteasomen nach 8 Tagen und erklären den relativen Verlust an konstitutiven 20S Proteasomen durch die massive Zerstörung von Hepatozyten durch cytotoxische T-Zellen und durch die starke Infiltration mit Leukozyten in den infizierten Lebern. Allerdings nehmen sie auch eine eventuell kürzere Halblebenszeit von konstitutiven 20S Proteasomen in entzündetem Gewebe an. HeLa-Zellen sind

humane neoplastisch transformierte Epithelzellen und aufgrund dieser Tatsache wahrscheinlich auch als Sonderfall zu betrachten, sowohl im Hinblick auf die Halblebenszeit der konstitutiven 20S Proteasomen, als auch auf ihre Reaktion auf Entzündungsmediatoren und Cytokine. Auch die humane Lymphoblastoid-Zelllinie T2 stellt sicher einen Sonderfall dar, da sie nur eine Kopie des Chromosoms 6 mit einer Deletion in der MHC-II-Region besitzt, welche die Gene für LMP2 und LMP7 einschließt. Es ist fraglich, inwieweit diese Zelllinien in Bezug auf ihre Regulationsmechanismen miteinander vergleichbar sind bzw. inwieweit sie „normale“ physiologische Reaktionen auf äußere Einflüsse (wie Cytokine oder Stress) zeigen. In HeLa-Zellen scheinen hauptsächlich Mischkomplexe zu entstehen, wenn die Zellen mit  $\gamma$ IFN induziert werden. Die Aktivität der 20S Proteasomen verändert sich im Vergleich zu denen der uninduzierten Zellen (Abb.24). Die PGPH-Aktivität sinkt um mehr als die Hälfte, während die chymotryptische Aktivität um das dreifache und die tryptische Aktivität um das fünffache ansteigt. Es ergibt sich folgendes Verhältnis der Aktivitäten: chymotryptisch > tryptisch > PGPH. Ein Grund hierfür sind sicher die unterschiedlichen Schnittpräferenzen der ausgetauschten Untereinheiten gegenüber ihren konstitutiven Homologen. Der Austausch von  $\delta$  gegen LMP2 führt hauptsächlich zum Absinken der PGPH- und zum Anstieg der chymotryptischen Aktivität, da LMP2 bevorzugt nach hydrophoben Aminosäuren schneidet. Genauer ließe sich das mit einer massenspektrometrischen Analyse der aus längeren Peptidsubstraten generierten Peptide der einzelnen Subtypen untersuchen. Zahlreiche Studien, u.a. von Sijts *et al.* (2000), haben das unterschiedliche Schnittverhalten von Immuno- gegenüber konstitutiven Proteasomen gezeigt. Einige Epitope werden nur von Immunoproteasomen generiert, wobei aber generell die MHC-I-relevante Antigenpräsentation auch mit konstitutiven Proteasomen stattfindet. Es scheint so, als würde durch die Bildung von Immuno- und Intermediär-Proteasom-Komplexen neben den konstitutiven die Diversität des Proteasom-Pools einer Zelle erhöht und so die Produktion einer größeren Bandbreite von Peptiden für die Antigen-Präsentation ermöglicht (Kloetzel, 2001).

### **4.3 Intermediär-Subtypen des 20S Proteasoms repräsentieren verschiedene Arten von Mischkomplexen**

Gerade im Hinblick auf die Intermediär-Subtypen war es interessant, ob es tatsächlich Mischkomplexe gibt und ob sogar innerhalb eines Proteasom-Komplexes sowohl die konstitutive, als auch die Immuno-Untereinheit eines Homologen-Paares vorkommen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies der Fall ist. Es wurden über einen ZZ-tag Komplexe isoliert, die sowohl die konstitutive als auch die Immuno-Untereinheit des homologen Paares  $\delta$ /LMP2 enthielten (Abb.14). Eine Spekulation über mögliche Mischkomplexe erfordert hier eine gründliche Betrachtung der Assemblierung des 20S Proteasoms. Griffin *et al.* (1998) und De *et al.* (2003) lieferten dazu umfangreiche Daten. Zunächst ist es wichtig zu beachten, dass LMP2 frühzeitig in die Preproteasomen eingebaut wird,  $\delta$  dagegen spät. Auch die  $\beta$ 5-Homologen MB1 und LMP7 erscheinen spät in den Precursor-Komplexen. Griffin *et al.* (1998) und Groettrup *et al.* (1996) fanden, dass bevorzugt reine Immunoproteasomen gebildet werden, wenn alle sechs katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten vorhanden sind. Der Einbau von MECL-1 wird verstärkt, sobald LMP2 vorhanden ist, LMP7 übt darauf keinen Einfluß aus. De *et al.* (2003) untersuchten u.a. den Einfluß der Propeptide von Z und MECL-1 auf die Assemblierung. Sie fanden heraus, dass das Propeptid von Z (ppZ) den Einbau von MECL-1 in konstitutive  $\delta$ /MB1-Proteasomen bzw. den Einbau von MB1 in LMP2/MECL-1-Immuno-Proteasomen ermöglicht. Das Propeptid von MECL-1 (ppMECL-1) hemmt allerdings nicht den Einbau oder die Prozessierung von Z in konstitutive Proteasomen. Es erhöht auch nur minimal den Einbau von Z in Immuno-Proteasomen gegenüber dem Z-Propeptid. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Proformen von LMP2 und LMP7 nicht akkumulieren, wenn kein MECL-1 vorhanden ist, was bedeutet, dass Z/LMP2/LMP7-Mischkomplexe gebildet werden. LMP7 wiederum kann in jede Kombination von  $\beta$ 1/ $\beta$ 2-Untereinheiten eingebaut werden. Ist es nicht vorhanden, akkumulieren aber Precursor-Proteasomen mit MECL-1/LMP2. Die Untereinheit Z scheint vor  $\delta$  eingebaut zu werden, folglich braucht Z für seinen Einbau keine benachbarte  $\beta$ 1-Untereinheit. Weiterhin vermuteten die Autoren, dass MB1 nicht eingebaut wird, wenn bereits eine  $\beta$ 1-Untereinheit vorhanden ist. Deshalb ist es kaum in Preproteasomen mit dem frühen LMP2 zu finden. Das Z-Propeptid in Kombination mit MECL-1 verstärkt dessen Einbau in Preproteasomen ohne  $\beta$ 1-Untereinheit und somit den Einbau von MB1. Deshalb fanden die Autoren auch Komplexe der Kombination  $\delta$ /MECL-1/MB1 in ihren Präzipitationen unter Verwendung von ppZ-MECL-1.



**Abb. 35: Alternative Wege für den Einbau von katalytischen Untereinheiten in die Ringe aus  $\beta$ -Untereinheiten. Die durchgestrichenen Möglichkeiten führen nicht zu reifen Proteasomen, sondern zur Akkumulation von Pre-proteasomen. M: MECL-1; 2: LMP2; 7: LMP7;  $\delta$ ; Z. Immuno-Untereinheiten sind gelb und konstitutive sind blau dargestellt. Quadrate:  $\beta$ 1; Kreise:  $\beta$ 2; Dreiecke:  $\beta$ 5. (De et al., 2003)**

Unter Beachtung dieser Informationen wären also vier verschiedene Halbproteasomen als Precursor-Komplexe möglich und kombinierbar (Abb.35). Daraus könnten theoretisch zehn 20S Proteasom-Komplexe gebildet werden (siehe Tabelle 9).

**Tab. 9: Zusammenstellung möglicher Mischkomplexe des 20S Proteasoms unter Beachtung der Daten aus Assemblierungsuntersuchungen. (farbig gekennzeichnet sind Komplexe mit identischen Hemiproteasomen)**

$\beta$ 1	$\beta$ 2	$\beta$ 5	$\beta$ 1	$\beta$ 2	$\beta$ 5	Subtyp
$\delta$	Z	MB1	$\delta$	Z	MB1	konstitutiv
$\delta$	Z	MB1	$\delta$	Z	LMP7	intermediär
$\delta$	Z	MB1	LMP2	Z	LMP7	intermediär
$\delta$	Z	MB1	LMP2	MECL-1	LMP7	intermediär
$\delta$	Z	LMP7	$\delta$	Z	LMP7	intermediär
$\delta$	Z	LMP7	LMP2	Z	LMP7	intermediär
$\delta$	Z	LMP7	LMP2	MECL-1	LMP7	intermediär
LMP2	Z	LMP7	LMP2	MECL-1	LMP7	intermediär
LMP2	Z	LMP7	LMP2	Z	LMP7	intermediär
LMP2	MECL-1	LMP7	LMP2	MECL-1	LMP7	Immuno-

Die Existenz von maximal vier 20S Proteasom-Subtypen in induzierten HeLa-Zellen bei 10 möglichen 20S Komplexen könnte bedeuten, dass ein Subtyp hier aus verschiedenen zusammengesetzten 20S Komplexen besteht, die die gleiche Oberflächenladung besitzen. In den 2D-PAGE-Analysen schienen alle Subtypen intermediär-Komplexe zu enthalten. Denkbar wäre natürlich auch, dass reine Immuno-Proteasomen gebildet wurden und dass diese aber nicht von einigen Mischkomplexen chromatographisch getrennt werden konnten, sodass in den 2D-PAGE-Mustern der Subtypen sowohl Immuno- als auch konstitutive Untereinheiten zu sehen waren. Das würde allerdings den Daten von

Dahlmann *et al.* (2000) widersprechen, die reine Immuno-Subtypen allerdings aus Rattengeweben chromatographisch von Intermediär-Subtypen abtrennen konnten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich nur gleichartige Halbproteasomen zusammenlagern und somit auch nur vier mögliche Komplexe gebildet werden können, die sich dann in vier Subtypen repräsentieren. Die chromatographische Trennung ist dann vielleicht nicht so exakt möglich, so dass die reinen konstitutiven und Immuno-Subtypen mit Untereinheiten aus den angrenzenden Intermediär-Subtypen verunreinigt werden. Allerdings sollte dieser Effekt durch Rechromatographie minimiert werden. Hier könnten aber auch die Modifikationen eine Rolle spielen, die eventuell vorhandene Ladungsunterschiede der verschiedenen Mischkomplexe maskieren.

## 4.4 Subzelluläre Lokalisation von 20S Proteasom-Subtypen in HeLaS3-Zellen

Es ist seit längerem bekannt, dass das Proteasom in verschiedenen Zellkompartimenten vorkommt und dass die Verteilung innerhalb der Zellen von vielen Faktoren beeinflusst wird (Wojcek & DeMartino, Review, 2003). Palmer *et al.*, 1996 fanden darüber hinaus Hinweise auf strukturelle Unterschiede der Proteasomen-Subpopulationen, indem sie die Verteilung bestimmter proteasomaler Untereinheiten auf die Zellfraktionen verglichen. Im Hinblick auf sehr spezielle Stoffwechsel- und Regulationsprozesse in den einzelnen Zellkompartimenten, wären strukturelle und damit verbundene funktionelle Unterschiede der 20S Proteasomen-Subpopulationen durchaus sinnvoll und denkbar. In der vorliegenden Arbeit sollte dies näher mit HeLaS3-Zellen untersucht werden, da diese wegen ihres nicht adhärenen Wachstums in Solubilisationskulturen kultiviert werden konnten und somit eine größere Menge an Zellen zur Verfügung stand. Auffallend war hier zunächst, dass HeLaS3-Zellen auch ohne Induktion mit  $\gamma$ IFN Immuno-Untereinheiten ausbilden. Möglicherweise sind dafür die Kulturbedingungen verantwortlich. Die Zellen wurden unter Durchmischung in „spinnerflasks“ gezogen und erreichten eine hohe Zelldichte. Die Zellen waren unter dem Mikroskop kugelförmig und bei hohen Zelldichten bildeten sie untereinander Cluster und Perlenkettenähnliche Strukturen aus, adhärten aber nie an den Oberflächen der Kulturgefäße. Denkbar wäre, dass die Zellen durch den fehlenden Kontakt zu Nachbarzellen und zur Matrix unter Stress geraten und so in eine Art Alarmzustand versetzt werden, wodurch in der Folge Immuno-Untereinheiten exprimiert werden. Es gibt bisher in der Literatur allerdings keine Hinweise auf diesen speziellen Fall. Kuckelkorn *et al.* (2000) fanden nach Stress erzeugenden Hitzeschock-Behandlungen eher den gegenteiligen Effekt bei murinen RMA-Zellen. Durch die Hitzeschock-Behandlung wurden die 20S Proteasomen inaktiv und resistent gegenüber einer Aktivierung mit SDS, was auf strukturelle Veränderungen der Untereinheiten  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ ) und  $\alpha 6$  (C2) zurückgeführt wurde. Darüber hinaus wurde die de novo-Synthese von 20S Proteasom gehemmt. Es waren keine Immuno-Untereinheiten nachweisbar. Auch zellulärer Stress, erzeugt durch Proteasom-Inhibition, führt nicht zu einer Hochregulierung von proteasomalen Immuno-Untereinheiten (mündliche Information von Heyken). Gegen oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder andere Radikale ist das 20S Proteasom relativ resistent (Shringarpure *et al.*, 2001), es wurde keine spontane Induktion von Immuno-Untereinheiten beobachtet. Es konnten aus dem Gesamt-Zelllysate von HeLaS3-Zellen drei 20S Proteasom-Subtypen getrennt werden, die sich in ihrem Muster von denen der adhärenen HeLa-Zellen unterscheiden (Abb.15). Die Subtypen waren bei den HeLaS3-Zellen nicht so deutlich voneinander trennbar, dominierend war hier der Subtyp II. Das Subtypen-Muster unterscheidet sich auch deutlich von denen mit  $\gamma$ IFN induzierten HeLa-Zellen nach 48, 72 bzw. 144 Stunden, obwohl der Vergleich der 2D-PAGE-Muster eine sehr ähnliche Untereinheiten-Zusammensetzung zeigt (Abbildungen 8, 10, 11, 12 und 15). Als Grund dafür sind eher unterschiedliche Modifikationen der proteasomalen Untereinheiten anzunehmen, als ihre Zusammensetzung als solche. Aus den HeLaS3-Zellen wurden nun die 20S Proteasomen-Subpopulationen der einzelnen Zellkompartimente Cytoplasma, Microsomen und Zellkern näher betrachtet. Die Kompartiment-Trennung wurde über die An- bzw. Abreicherung bestimmter Markerproteine kontrolliert. Zunächst konnte anhand der präparierten Protein-Menge eine Aussage über die quantitative Verteilung von 20S Proteasom aus HeLaS3-Zellen auf die Zellkompartimente getroffen werden: es wurden vom Gesamtproteasom 70-72% im Cytoplasma, 25-27% in den Microsomen und 3-5% in den Zellkernen gefunden. In Hefe z.B., die kein adaptives Immunsystem und auch keine Immuno-Proteasomen besitzt, sind 80% der 26S Proteasomen im *Nucleus* und *Nuclear Envelope* lokalisiert (Enenkel *et al.*, 1998), was ein Ausdruck dafür ist, dass bei der hohen Teilungsrate der Hefezellen der Protein-turnover hauptsächlich in diesen Kompartimenten stattfindet. Die subzelluläre Lokalisation von Proteasom unterliegt sehr starken Schwankungen, sowohl bei den



unterschiedlichen Spezies, als auch innerhalb einer Spezies im Hinblick auf Zellzyklus, Reifegrad der Zelle und unter pathophysiologischen Aspekten. All dies lässt Rückschlüsse auf eine Verbindung zwischen subzellulärer Lokalisation und Funktion der Proteasomen zu. Beim Vergleich der Elutionsprofile der 20S Proteasom-Subpopulationen fiel auf, dass der Elutionsbereich zwar bei allen Proben derselbe war, dass sich aber die Muster deutlich unterschieden (Abb.18). Das Profil der cytoplasmatischen 20S Proteasom-Subtypen war dem der HeLa-Zellen nach 144 stündiger Inkubation mit  $\gamma$ IFN noch am ähnlichsten (vgl. Abb.11 und 18), wenn man die Nummerierung der Subtypen außer acht lässt. Da es sich bei den Subtypen eventuell um eine Summe verschiedener Mischkomplexe handelt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Subtypen mit gleichem Elutionsverhalten auch strukturell identisch sind. Es bedeutet lediglich, dass die Oberflächenladung der Komplexe die gleiche ist. Es wurde die Untereinheiten-Zusammensetzung mittels 2D-PAGE und Westernblot-Analyse verglichen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Verteilung der katalytischen Untereinheiten der Subtypen aus HeLaS3-Zellen:

**Tab. 10: Verteilung der katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten in den 20S Proteasom-Subtypen der einzelnen Zellkompartimente in HeLaS3-Zellen (Auswertung der 2D-PAGE, optische Intensität: ++ stark; + gut sichtbar; (+) schwach). MECL-1 konnte bei den microsomalen Subtypen nicht eindeutig lokalisiert werden.**

Subtyp Untereinheit		CII	CIII	CIV	MI	MII	MIII	MIV	NII	NIII
$\delta$	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+
MB1	(+)	+	+	+	+	+	++	+	(+)	+
Z	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
LMP2	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	+	+
LMP7	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	++	+
MECL-1	+	++	+	+	?	?	?	?	(+)	+

Nach Tabelle 10 zu urteilen haben nicht, wie erwartet, die microsomalen 20S Proteasom-Subtypen den höchsten Anteil an Immuno-Untereinheiten, sondern eher die nucleären Proteasomen. Bei den microsomalen Proteasomen wird angenommen, dass diese hauptsächlich am ER-assziierten Proteinabbau (ERAD) und an der Generierung von MHC I-relevanten Epitopen beteiligt sind, also immunologische Funktionen haben. In den 2D-PAGE-Mustern (Abb.21) haben sie aber verglichen mit den cytoplasmatischen Proteasom-Subtypen (Abb.20) lediglich einen höheren Anteil an LMP2, welcher wiederum niedriger als der der nucleären Subtypen zu sein scheint. Palmer *et al.* (1996) fanden ebenfalls bei den microsomalen Proteasomen aus Rattenleber einen höheren Anteil an LMP2 im Vergleich mit der cytoplasmatischen Fraktion. Allerdings fanden sie sehr wenig LMP2 in der nucleären Fraktion, was nicht den Beobachtungen in dieser Arbeit entspricht. Gründe hierfür sind möglicherweise in der anderen Art des von Palmer *et al.* untersuchten Materials (Rattenleber) oder in der unterschiedlichen experimentellen Prozedur zu suchen. Fabunmi *et al.* (2000) fanden in HeLa-Zellen nach Induktion mit  $\gamma$ IFN eine Anreicherung von Immunoproteasomen und PA 28-Regulator im Zellkern in sogenannten PML (promyelocytic leukemia oncoprotein) bodies. PML bodies sind diskrete subnucleäre Domänen, welchen verschiedene Funktionen zugeschrieben werden, z.B. Transkriptionsregulation, Tumorsuppression, Apoptose und Speicherung nucleärer Proteine. Bei verschiedenen pathologischen Prozessen, wie viralen Infektionen und akuter promyeloischer Leukämie wird eine Auflösung dieser Strukturdomänen beobachtet, was auch eine Zerstreuung in ihnen gespeicherter Komponenten bedeutet. Es wird die hohe Pathogenität dieser Krankheiten teilweise auf die Tatsache zurückgeführt, dass dadurch Defekte in der Antigen-Prozessierung und Präsentation auftreten.

## 4.5 Die 20S Proteasom-Subtypen aus den verschiedenen Zellkompartimenten unterscheiden sich strukturell und in ihren proteolytischen Aktivitäten.

Schaut man sich die proteolytischen Aktivitäten der einzelnen Subtypen gegenüber fluorogenen Peptidsubstraten an, so findet man auch hier Unterschiede (Abb.25). Bei den cytoplasmatischen und den microsomalen Subtypen ist die PGPH-Aktivität die höchste, obwohl in diesen Subtypen LMP2 zumindest teilweise gegen  $\delta$  ausgetauscht ist, bei den cytoplasmatischen Subtypen allerdings nur in geringem Maße. Die chymotryptische und die tryptische Aktivität sind bei den microsomalen Subtypen am niedrigsten. In keiner Fraktion zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Aktivitäten wie bei den adhärennten HeLa-Zellen nach 144 stündiger Inkubation mit  $\gamma$ IFN (Abb.24), obwohl die Zusammensetzung der katalytischen Untereinheiten ähnlich ist. Denkbar wären hier veränderte Bindungseffekte der benachbarten Untereinheiten (Djaballah *et al.*, 1992 bzw. 1993), welche durch post-translationale Modifikationen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung u.a. hervorgerufen werden könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Glykosylierung als post-translationale Modifikation der 20S Proteasomen näher untersucht.

## 4.6 Glykosylierung als post-translationale Modifikation

Man weiß inzwischen, dass die meisten Proteine Glykoproteine sind, mit einem kovalent gebundenen Kohlenhydratanteil von < 1 bis > 90% Gewichtsanteil. Sie finden sich in sämtlichen Proteinklassen mit den unterschiedlichsten Funktionen, z.B. Strukturproteine, Hormone, Rezeptoren usw. Oligosaccharide können auf zweierlei Art mit dem Protein verknüpft sein: N-glykosidisch und O-glykosidisch. N-Glykane haben eine feste Kernstruktur. Sie sind  $\beta$ -glykosidisch an die  $\gamma$ -Aminogruppe von Asparagin in der Sequenz Asn-X-Ser/Thr gebunden. Das Kernoligosaccharid besteht aus zwei N-Acetylglucosaminresten und drei verzweigten Mannoseresten, an welche sich mit großer Variationsbreite verschiedene Oligosaccharide mit oder ohne weitere Verzweigung anschließen können. Die häufigste O-glykosidische Fixierung wird über ein Kerndisaccharid vermittelt, welches  $\alpha$ -glykosidisch mit Serin oder Threonin verknüpft ist und aus  $\beta$ -Galactosyl- 1,3 - $\alpha$ - N-Acetylgalactosamin besteht. Es kommen aber auch Galaktose, Mannose und Xylose vor, die  $\alpha$ -glykosidisch an Serin oder Threonin gebunden sind. O-Glykane sind weniger gut charakterisiert als N-Glykane. Sie sind oft an hochglykosylierten Bereichen im Protein konzentriert, die viel Serin und Threonin enthalten. N-Glykane sind meist gleichmäßiger auf das Protein verteilt, ihr Aufbau ist systematischer, oft sind sie stark verzweigt. Durch ihre Hydrophilie und ihre sterischen Ausmaße erzwingen Kohlenhydrate eine gestreckte Konformation, sie binden bevorzugt an  $\beta$ -Faltblattregionen im Protein. O- und N-Glykane dienen u.a. als Marker für den Zustand und das Alter des Proteins, für seine Lokalisation oder als Mittler in Zell-Zell-Erkennungsprozessen. Auch als physiologische Schalter ähnlich wie Phosphorylierungen werden Glykosylierungen diskutiert.

### 4.6.1 Nucleäre und cytoplasmatische Glykosylierung

In den letzten Jahren entfernte man sich mehr und mehr von der Ansicht, dass glykosylierte Proteine meist große komplexe Glykanstrukturen tragen und sich ausschließlich an der Zelloberfläche oder innerhalb des Lumens von subzellulären Organellen wie ER oder Golgi befinden. Mittlerweile wurden komplexe sowie einfache Glykosylierungen auch an cytoplasmatischen und nucleären Proteinen gefunden. Vielfach wurden diese Befunde mit Hilfe pflanzlicher Lectine ermittelt. An so erhaltenen Ergebnissen wurde vielfach Kritik geübt, da einige Lectine (z.B. ConA) unter bestimmten Umständen auch Moleküle über unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen binden können. Hypothesen über „ungewöhnliche“ Glykosylierungsphänomene, gefunden durch Lectintests, sollten daher unbedingt durch strukturelle Analysen gestützt werden. Nichtsdestoweniger zeigten Lectin-Bindungsstudien u.a., dass GlcNAc-, Mannose- und Fucose-haltige Glykane im Cytoplasma und im Nucleus zahlreich vorkommen, zum Teil in Form komplexer Glykane.

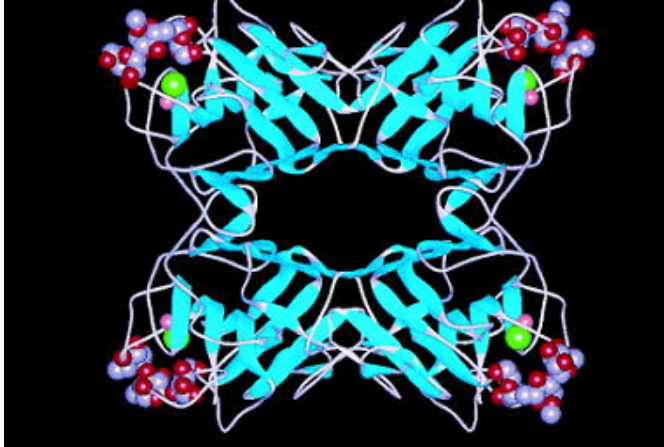


Abb. 36: Struktur von tetramerem ConA mit Trimannosidliganden (Kalottenmodell in lila und rot) und mit den koordinativ gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  Ionen (grün und pink). (Naismith & Field, 1996) Es wurde gezeigt, dass Neuraminsäure-haltige Glykane an der cytoplasmatischen Seite der *nuclear envelope* vorkommen. Das Lectin SNA band an die Nucleoporine p62 und p180, von denen bekannt war, dass sie O-GlcNAc enthielten (Emig et al., 1995). Anfang der 90er Jahre haben Studien von Duverger, Monsigny und Kollegen Hinweise darauf gegeben, dass Kohlenhydrat-Reste eventuell als Nucleäre Lokalisationssignale fungieren könnten (Duverger et al., 1993, 1995, 1996; Roche & Monsigny, 1996).

#### 4.6.2 Die Rolle von O-GlcNAc-Modifikationen

Viele nucleäre und cytoplasmatische Proteine sind dynamisch modifiziert mit O-gekoppelten N-Acetylglucosaminresten an Serin oder Threonin, oft alternierend oder alternativ zu einer Phosphorylierung an diesen Aminosäuren (Comer & Hart, 2000). In einigen Fällen findet die Regulation der Proteinfunktion durch O-Phosphat oder O-GlcNAc reziprok an den selben Hydroxylresten statt. Studien an Casein Kinase II haben gezeigt, dass sich die glykosylierte Form von der phosphorylierten unterscheidet, obwohl die Bindungsstellen nur wenige Aminosäuren voneinander entfernt sind. Diese Daten unterstützten die These, dass die Glykosylierung eine Phosphorylierung an benachbarter Stelle verhindern kann, vermutlich durch sterische Effekte oder Modulation der lokalen Proteinstruktur (Zachara & Hart, 2004).

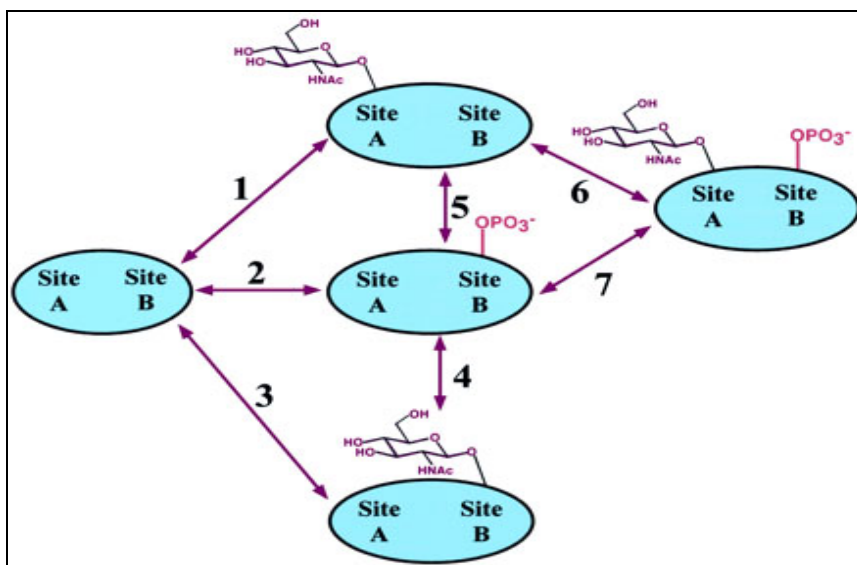


Abb. 37: Komplexes Zusammenspiel zwischen O-GlcNAc und Phosphat-Modifikation. Ein Protein kann glykosyliert (1 und 3) oder phosphoryliert (2) werden. Beide Modifikationen

**können alternativ an der selben Stelle (4) oder an unterschiedlichen Stellen (5) erfolgen oder die beiden Modifikationen bedingen und beeinflussen sich gegenseitig (1-6, 2-7). All diese Modifikationen können einer Modulation der Proteinfunktion dienen (Comer & Hart, 2000).**

Die verantwortlichen Enzyme für die O-GlcNAcylierung bzw. Deglykosylierung sind die O-GlcNAc-Transferase (OGT) und die  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase). Beide Enzyme werden komplex reguliert und sowohl cytosolisch als auch nucleär lokalisiert (Kreppel *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 2002). Inhibitionsstudien beider Enzyme haben gezeigt, dass die korrekte O-GlcNAc-Modifikation für eukaryontische Zellen essentiell ist (Fang *et al.*, 1996). Auch in vielen humanen Krankheiten spielt O-GlcNAc eine wichtige Rolle: Das  $\beta$ -Amyloid-Precursor-Protein welches  $\beta$ -Amyloid Peptide bei Morbus Alzheimer verursacht, ist O-GlcNAc-modifiziert (Griffith *et al.*, 1995). Das microtubuli-assoziierte Protein Tau, welches eine Hauptkomponente der neurofibrillären Cluster im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten ist, ist in gesundem Gewebe mit O-GlcNAc modifiziert. Bei Alzheimer-Patienten ist es dagegen hyperphosphoryliert (Arnold *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1996). Es wird ein kausaler Zusammenhang zwischen der Störung des Glucosestoffwechsels in alternden Neuronen und der Abnahme an O-GlcNAc-Modifikationen und dadurch verursachten neurodegenerativen Erkrankungen vermutet. Ebenso gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit gestörter O-GlcNAcylierung und Krebs; viele Transkriptionsfaktoren und auch das Tumor-Suppressor Protein p53 werden durch GlcNAc modifiziert (Shaw *et al.*, 1996).

### 4.6.3 Glykosylierung des Proteasoms ?

Das Proteasom ist in viele für die Zelle lebenswichtige Prozesse involviert und seine Aktivität wird über komplexe Mechanismen reguliert. Auch eine Phosphorylierung einiger proteasomaler Untereinheiten ist bekannt, so ist es durchaus wahrscheinlich, dass auch hier eine Regulierung der Aktivität durch O-GlcNAc-Modifikation stattfindet. Erste Hinweise darauf erhielten Zhang *et al.* (2003) in ihren Untersuchungen. Ebenso wahrscheinlich ist es, dass einzelne Untereinheiten des Proteasoms mit anderen Mono- oder Oligosacchariden assoziiert sind, da diese Form der Modifikation vielfache Möglichkeiten der Kontrolle der Proteasom-Assemblierung, der Bindung an andere Strukturen und der Lokalisation innerhalb der Zelle bietet. Die Stützung dieser Hypothese durch strukturelle Daten wird aber weiterhin schwierig sein, da die zur Verfügung stehenden Methoden begrenzt und oft für die sehr geringen Mengen an Kohlenhydraten nicht empfindlich genug sind. Außerdem sind die Bindungen der Zuckerreste oder die Zuckerreste selbst teilweise sehr instabil. In den Versuchen, in denen gereinigtes 20S Proteasom mit Neuraminidase verdaut und danach an MiniQ in die Subtypen aufgetrennt wurde, war zu erkennen, dass es sich nur um minimale Veränderungen der Ladung handelt (Abb.27). Die Subtypen eluierten im selben Konzentrationsbereich des Salzgradienten, ihre Zahl blieb unverändert, lediglich die Mengenverteilung verschob sich etwas in Richtung der positiveren Oberflächenladung. Dem gegenüber steht die relativ starke Reaktion mit dem NANA-erkennenden Lectin TML, die in der 2D-PAGE fast das komplette Muster der 20S Proteasom-Untereinheiten zeigte (Abb.26). Ein Grund für diese Diskrepanz ist eventuell, dass für die Neuraminidase bei dem nativen Komplex nicht alle Neuraminsäure-Reste für die Abspaltung zugänglich waren. Die in der 2D-PAGE denaturierten Untereinheiten konnten dagegen mit dem Enzym komplett desialyliert werden, eine nachfolgende Inkubation mit dem Lectin ergab keine Reaktion mehr. Mit den anderen verwendeten deglykosylierenden Enzymen konnte weder eine Veränderung des Elutionsprofils, noch eine Entfernung der Lectinfärbung erreicht werden. Der Grund dafür können die Spezifitäten der Enzyme sein, die andere als die vorhandenen Bindungen und Sequenzen erkennen.

*Tritrichomonas mobilensis* ist ein Protozoon aus dem Darm von Totenkopffäffchen (*Squirrel monkey*). Das *Tritrichomonas mobilensis* Lectin formt multimere Komplexe mit dem Molekulargewicht 556 und 491 kDa. Es benötigt anders als die Pflanzenlectine keine bivalenten Kationen für die Reaktion mit Kohlenhydraten. TML ist hochglykosyliert mit ca. 20% Kohlenhydratanteil (Babal *et al.*, 1994). Nach Inkubation mit Papain wurde eine Zunahme der Agglutinationsaktivität von TML beobachtet (Pindak *et al.*, 1988). Es wird in der Literatur als hochspezifisch beschrieben (Babal *et al.*, 1996 und 1999). Die sehr starke Reaktion mit den proteasomalen Untereinheiten in den 2D-PAGE-Analysen könnte der Tatsache geschuldet sein, dass das große multimere TML-Molekül eine starke Biotinylierung aufweist und somit auch stärker angefärbt wird.

Über die Funktion der Glykosylierung des Proteasoms kann bisher noch nicht viel gesagt werden. Erste Hinweise auf eine Auswirkung auf die Aktivität bei 26S Proteasom gibt es bereits. Zhang *et al.* (2003) fanden eine Hemmung der chymotryptischen Aktivität gegenüber Suc-LLVY-MCA von 26S

Proteasom durch die OGT-vermittelte Glykosylierung mit GlcNAc, allerdings nicht bei 20S Proteasom. Sie fanden keine Hemmung mit dem chymotryptischen Substrat Z-GGL-MCA und auch keine Hemmung der tryptischen Aktivität bei 26S und 20S Proteasom. Begründet wurde dies mit der höheren Hydrophobizität von Suc-LLVY-MCA, nicht mit einer Modifizierung der Untereinheit  $\beta 5$ . Andererseits beobachteten sie bei den glykosylierten Proben eine Hemmung des Abbaus von Sp1, eines proteasomalen Substrates, und eine Hemmung der ATPase-Aktivität des 19S Regulator-Komplexes.

## Literatur

- Alonso, AC.**, Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K.: Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med.*1996. 2(7). 783-7
- Apcher, S.**, Heink, S. ,Zantopf, D., Kloetzel, P.M., Schmid, H.P., Mayer, R.J., Krüger, E.: Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Letters.* 2003. 553. 200-204
- Arendt, C.S.**, Hochstrasser, M.: Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *EMBO J.* 1999. 18(13). 3575-85
- Arnold, CS.**, Johnson, G., Cole, R., Dong, DLY., Lee, M. and Hart, GW.: The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *JBC.* 1996. 271(46). 28741-28744
- Attaix, D.**, Taillandier, D.: The critical role of the ubiquitin - proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca<sup>2+</sup> - dependent systems. *Advances in Molecular and Cell Biology.* 1998. 27. 235 - 266
- Attaix, D.**, Aurousseau, E., Combaret, L.,Kee, A., Larbaud, D., Railliere, C., Souweine, B., Taillandier, D., Tilignac, T.: Ubiquitin-proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca<sup>2+</sup>-dependent systems. *Adv. Mol. Cell Biol.* 1998. 38. 153-165
- Babal, P.**, Gardner, W.A.: Histochemical localization of sialylated glycoconjugates with Tritrichomonas mobilensis lectin (TML). *Histol Histopathol.* 1996. 11(3). 621-31
- Babal, P.**, Pindak, FF, Wells, D.J., Gardner, W.A.: Purification and characterization of a sialic acid-specific lectin from Tritrichomonas mobilensis. *Biochem. J.* 1994. 299. 341-46
- Bradford, M.M.**: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*1976.72.248-254
- Barret, A.J.**: Fluorimetric assays for cathepsin H with methylcumarylamide substrates. *Biochem. J.* 1980. 187. 909-912
- Bochtler, M.**, Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., Huber, R.: The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.* 1999. 28. 295-317
- Brooks, P.**, Fuertes, G., Muraay, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M., Hendil, K. Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, AJ.: Subcellular Localization of proteasomes and thier regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J.* 2000. 346. 155-161
- Cagney, G.**, Uetz, P., Fields, S.: Two-hybrid analysis of the Saccharomyces cerevisiae 26S proteasome. *Physiol. Genomics.* 2001. 7(1). 27-34
- Chu-Ping, M.**, Slaughter, C.A., DeMartino, G.N.: Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (marcopain). *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. 1119. 303-311
- Claverol, S.**, Burlet-Schiltz, O., Girbal-Neuhauser, E., Gairin, JE., Monsarrat, B.: Mapping and Structural Dissection of Human 20S Proteasom Using Proteomic Approaches. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2002. 18. 567-578
- Comer, FI.** & Hart, GW.: O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *JBC.* 2000. 275. 29179-29182
- Confalonieri, F.** & Duguet, MA.: 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays.* 1995. 17. 639-650
- Coux, O.**, Tanaka, K., Goldberg, A.: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.*1996. 65. 801-847
- Dahlmann, B.**, Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., Kloetzel, PM.: Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *JMB.* 2000. 303. 643-653

- Dahlmann, B., Kopp, F., Kristensen, P., Hendil, K.:** Identical subunit topographies of human and yeast 20S proteasomes. *Arch Biochem Biophys.* 1999. 363. 296-300
- Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Thierry-Mieg, D., Reboul, J., Boulton, S., Walhout, A., Coux, O., Vidal, M.:** A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO J.* 2001. 2(9). 821-828
- De Mot, R., Nagy, I., Walz, J.:** Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 1999. 7. 88-92
- Djaballah, H., Rivett, A.J.:** Peptidylglutamyl-peptide hydrolase activity of the multicatalytic proteinase complex: evidence for a new high-affinity site, analysis of cooperative kinetics, and the effect of manganese ions. *Biochemistry.* 1992. 31. 4133-4141
- Djaballah, H., Rowe, A.J., Harding, S.E., Rivett, A.J.:** The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity. *Biochem J.* 1993. 292. 857-862
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., Rechsteiner, M.:** Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *JBC.* 1992. 267. 22369-77
- Duverger, E., Carpentier, V., Roche, A.C., Monsigny, M.:** Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol. *Exp. Cell Res.* 1993. 207. 197-201
- Duverger, E., Pellerin-Mendes, R., Mayer, R., Roche, A.C., Monsigny, M.:** Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *J. Cell. Sci.* 1995. 108. 1325-1332
- Duverger, E., Roche, A.C., Monsigny, M.:** N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins. *Glycobiology.* 1996. 6. 381-386
- Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C., Orlowski, M.:** Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y and Z subunits by LMP7, LMP2 and MECL-1 and changes in properties and specificity. *JBC.* 1997. 272. 11824-31
- Emig, S., Schmalz, D., Shakibaei, M., Buchner, K.:** The nuclear pore complex protein p62 is one of several sialic acid-containing proteins of the nuclear envelope. *JBC.* 1995. 270. 13787-13793
- Enenkel, C., Lehmann, A., Kloetzel, P.M.:** Subcellular distribution of proteasomes implicates a major localisation of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* 1998. 17. 6144-6154
- Fabunmi, R., Wigley, C.W., Thomas, P., DeMartino, G.N.:** Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *Journal of cell science.* 2000. 114. 29-36
- Fang, B., Miller, M.W.:** Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-GlcNAc during cell division. *Exp. Cell. Res.* 2001. 263. 243-253
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., Kloetzel, P.M.:** 20S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16S preproteasome complexes. *J. Mol. Biol.* 1994. 236. 975-81
- Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L.:** Gamma-interferon and expression of MHC- genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature.* 1993. 365. 264-267
- Gaczynska, M., Goldberg, A.L., Tanaka, K., Hendil, K.B., Rock, K.L.:** Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *JBC.* 1996. 271. 17275-17280
- Gillesen, S., Groettrup, M., Cerny, T.:** The proteasome, a new target for cancer therapy. *Onkologie.* 2002. 25. 534-539
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., Finley, D.:** The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 1998. 18. 3149-62
- Goldberg, A.L., Elledge, S.J., Harper, J.W.:** The cellular chamber of doom. *Scientific American.* 2001. 68-73
- Griffin, T., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., van Kaer, L., Monaco, J., Colbert, R.A.:** Immunoproteasome Assembly: Cooperative Incorporation of interferon gamma-inducible subunits. *J. Exp. Med.* 1998. 187. 97-104
- Griffith, L.S., Mathes, M., Schmitz, B.:** Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-

- acetylglucosamine. *J Neurosci Res.* 1995. 41(2). 270-8
- Groettrup**, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, TP., Schild, H., Rammensee, HG., Koszinowski, UH., Kloetzel, PM.: A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature.* 1996. 381. 166-168
- Groettrup**, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, PM.: A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 1996. 26. 863-69
- Groettrup**, M., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, PM.: The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. 94. 8970-75
- Groll**, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, HD., Huber, R.: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature.* 1997. 386. 463-71
- Groll**, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, DH., Huber, R.: The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci.* 1999. 96(20). 10976-83
- Groll**, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L. Rubin, DM., Huber, R., Glickman, MH., Finley, DA.: Gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 2000. 7. 1062-67
- Heinemeyer**, W., Kleinschmidt, JA., Saidowsky, J., Escher, C., Wolf, DH.: Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.* 1991. 10. 555-562
- Heinemeyer**, W., Hilt, W., Wolf, DH.: Active sites and assembly of the 20S proteasome. *Proteasomes: The world of regulatory proteolysis.* 2000. 1.Aufl. Georgetown, Texas, U.S.A. eureka.com. S.48-59. ISBN 1-58706-011-6
- Hendil**, KB., Kristensen, P., Uerkevitz, W.: Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem. J.* 1995. 305. 245-252
- Hendil**, KB.: The 19S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. *Biochem. Int.* 1988. 17. 471-478
- Hershko**, A., Ciehanover, A.: Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Ann Rev Biochem.* 1982. 51. 335-364
- Hideshima**, T., Richardson, PG., Anderson, KC.: Targeting proteasome inhibition in hematologic malignancies. *Rev Clin Exp Hematol.* 2003. 7(2). 191-204
- Hilt**, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T., Wolf, DH.: The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *JBC.* 1993. 268. 3479-86
- Hough**, R., Pratt, G., Rechsteiner, M.: Ubiquitin-lysozyme conjugates. *JBC.* 1986. 261. 2400-2408
- Jungblut**, PR., Seifert, R.: Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of HL-60 leukemic cells. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1990. 21. 47-58
- Khan**, S., van den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, PA., Groettrup, M.: Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *Journal of Immunology.* 2001. 167. 6859-6868
- Kisselev**, AF., Akopian, TN., Castillo, V., Goldberg, AL.: Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol. Cell.* 1999. 4. 395-402
- Kisselev**, AF., Akopian, TN., Woo, KM., Goldberg, AL.: The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes. Implications for understanding the degenerative mechanism and antigen presentation. *JBC.* 1999. 274. 3363-71
- Kloetzel**, PM., Ossendorp, F.: Proteasome and peptidase function in MHC - class -I- mediated antigen presentation. *Curr. Opinion in Immunology.* 2004. 16(1). 76 –81
- Kloetzel**, PM.: Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell.* 2001. 2. 179-187
- Knowlton**, JR., Johnston, SC., Whitby, FG., Realini, C., Zhang, Z., Rechsteiner, M., Hill, CP.: Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature.* 1997. 390. 639-643



- Kreppel**, LK., Blomberg, GW., Hart, G.: Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *JBC*. 1997. 272. 9308-9315
- Kristensen**, P., Johnsen, AH., Uerkvitz, W., Tanaka, K. and Hendil, KB.: Human proteasome subunits from 2-dimensional gels identified by partial sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. 205. 1785-1789
- Krüger**, E., Kloetzel, PM., Enenkel, C.: 20S proteasome biogenesis. *Biochimie*. 2001. 83. 289-93
- Kuckelkorn**, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M. Kloetzel, PM. Incorporation of major histokompatibility complex- encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon –gamma. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25. 2605-2611
- Kuckelkorn**, U., Knühl, C., Boes-Fabian, B., Drung, I., Kloetzel, PM.: The Effekt of heat shock on 20S/26S proteasomes. *Biol. Chem.*. 2000. 381. 1017-1023
- Kuckelkorn**, U., Knuehl, C., Boes-Fabian, B., Drung, I., Kloetzel, PM.: The effect of heat shock on 20S/26S proteasome. *Biol. Chem.* 2000. 381. 1017-1023
- Liu**, Q., Shang, F., Guo, W., Hobbs, M., Valverde, P., Reddy, V., Taylor, A.: Regulation of the ubiquitin proteasome pathway in human lens epithelial cells during the cell cycle. *Exp. Eye Res.* 78(2). 2003. 197-205
- Löwe**, J., Stock, D., Jap, B.: Crystal structure of 20S proteasome from archeon, thermoplasma acidophilum. *Science*. 1995. 268. 533-539
- Lu**, X., Michaud, C., Orlowski, M.: Heat shock protein-90 and the catalytic activities of the 20S proteasome (multicatalytic proteinase complex). *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. 387. 163-171
- Mason**, G., Hendil, KB., Rivett, AJ.: Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. Identification of two subunits and the effect of phosphorylation on activity. *Eur. J. Biochem.* 1996. 238. 453-462
- Merforth**, S., Kuehn, L., Osmer, A., Dahlmann, B.: Alteration of 20S proteasome-subtypes and proteasome activator PA28 in skeletal muscle of rat after induction of diabetes mellitus. *IJBCB*. 2002. 35. 740-48
- Naismith**, JH., Field, RA.: Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *JBC*. 1996. 271(2). 971-76
- Orlowski**, M. & **Wilk**, S.: Catalytic Activities of the 20S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000. 383/1. 1-16
- Orlowski**, M.: The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*. 1990. 29. 10289-97
- Palmer**, A., Rivett, AJ., Thomson, S., Hendil, KB., Butcher, W. Fuertes, G. and Knecht, E.: Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem. J.* 1996. 316. 401-407
- Pindak**, F., Pindak, M., Gardner, WA., Abee, CR.: Basic properties of tritrichomonas mobilensis hemagglutinin. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988. 26(8). 1460-1463
- Ramos**, PC., Marques, AJ., London, MK., Dohmen, RJ. : Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes. *JBC*. 2004. 279(14). 14323-30
- Rechsteiner**, M., Hoffman, L., Dubiel, W.: The multicatalytic and 26S proteases. *JBC*. 1993. 268. 6065-6068
- Reits**, EA., Benham, AM., Plougastel, B., Neefjes, J., Trowsdale, J.: Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* 1997. 16. 6087-94
- Rivett**, AJ., Palmer, A., Knecht, E.: Electron Microscopic Localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem. and Cytochem.* 1992. 40(8). 1165-72
- Rivett**, AJ.: The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol. Chem.*. 1989. 264. 12215-9
- Roche**, AC., Monsigny, M.: Trafficking of endogenous glycoproteins mediated by intracellular lectins: Facts and hypotheses. *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* 1996. 6. 188-201

- Ruepp**, A., Eckerskorn, C., Bogyo, M., Baumeister, W.: Proteasome is dispensable under normal but not under heat-shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* 1998. 425. 87-90
- Schliephacke**, M., Kremp, A., Schmid, HP., Köhler, K., Kull, U.: Prosomes (proteasomes) of higher plants. *European Journal of Cell Biology.* 1991. 55. 14-121
- Schmid**, HP., Vallon, R., Kreutzer-Schmid, C., Pouch, MN., Badaoui, S., Boissonnet, G., Briand, M., Briand, Y., Buri, J.: Glycosylation and deglycosylation of proteasomes (prosome) from calf liver cells: high abundance of neuraminic acid. *Biochimie.* 1993. 75. 905-910
- Schmidt**, M., Zantopf, D., Kraft, R., Kostka, S., Preissner, R., Kloetzel, PM.: Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of  $\beta$ -subunits into the 20S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 1999. 288. 117-128
- Schmidtke**, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frömmel, C., Löwe, J., Huber, R., Kloetzel, PM., Schmidt, M.: Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* 1996. 15. 6887-98
- Schmidtke**, G., Eggers, M., Ruppert, T., Groettrup, M., Koszinowski, UH, Kloetzel, PM.: Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein. *J Exp. Med.* 1998. 187. 1641-46
- Shaw**, P., Freeman, R., Bovey, R., Iggo, R.: Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene.* 1996. 12(4). 921-30
- Shringarpure**, R., Grune, T., Davies, KJA. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *CMLS.* 2001. 58. 1442-1450
- Sijts**, AJ., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., Kloetzel, PM.: Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* 2000. 191. 503-514
- Sijts**, AJ., Standera, S., Toes, RE., Ruppert, T., Beekman, NJ., van Veelen, PA., Ossendorp, FA., Melief, CJ., Kloetzel, PM.: MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.* 2000. 164. 4500-4506
- Stohwasser**, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, PM., Holzhütter, HG.: Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur. J. Biochem.* 2000. 267. 6221-30
- Tanahashi**, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, KB., Tanaka, K.: Hybrid Proteasomes: Induction by Interferon- $\gamma$  and contribution to ATP-dependent Proteolysis. *JBC.* 2000. 275. 14336-14345
- Tanaka**, K., Tamura, T., Yoshimura, T., Ichihara, A.: Proteasomes: protein and gene structures. *New Biol.* 1992. 4. 173-187
- Van Hall**, T., Sijts, AJ, Camps, M, Offringa, R., Melief, C., Kloetzel, PM., Ossendorp, F.: Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J Exp Med.* 2000. 192(7). 483-94
- Wehren**, A., Meyer, H., Sobek, A., Kloetzel, PM., Dahlmann, B.: Phosphoaminoacids in proteasome subunits. *Biol. Chem.* 1996. 377. 497-503
- Weissman**, AM.: Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol. Today.* 1997. 18. 189-198
- Wells**, L., Gao, Y., Mahoney, K., Vosseller, C., Chen, C., Rosen, A., Hart, G.: Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmatic beta-N-acetylglucosaminidase O-GlcNAcase. *JBC.* 2002. 277. 1755-1761
- Wheatley**, D.: Significance of the Rapid Degradation of Newly Synthesized Proteins in Mammalian Cells: A Working Hypothesis. *J. Theor. Biol.* 1982. 98. 283-300
- Whitby**, FG., Masters, EI., Kramer, L., Knowlton, JR., Yao, Y., Wang, CC., Hill, CP.: Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature.* 2000. 408. 115-120

- Wilk, S., Chen, WE., Magnusson, RP.:** Properties of the nuclear proteasome activator PA28 gamma (REG gamma). *Arch. of Biochem. Biophys.* 2000. 383(2). 265-271
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, PM., Krüger, E.:** Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7 ( $\beta 5i$ ) incorporation into 20S Proteasomes. *J. Mol. Biol.* 2000. 301. 1-9
- Wojcik, C. & DeMartino, GN.:** Intracellular localization of proteasomes. *IJBCB.* 2003. 35. 579-589
- Wojcik, C.:** Proteasome activator subunit PA28 alpha and related Ki antigen (PA28 gamma) are absent from the nuclear fraction purified by sucrose gradient centrifugation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 1999. 31. 273-276
- Yang, Y., Waters, JB., Fröh, K., Peterson, PA.:** Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992. 89. 4928-4932
- Yang, Y., Fröh, K., Ahn, K., Peterson, PA.:** In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *JBC.* 1995. 270. 27687-94
- Zachara, N., Hart, G.:** O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmatic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Bioch. Biophys. Acta.* 2004. 1673. 13-28
- Zaiss, D., Standera, S., Holzhütter, HG., Kloetzel, PM., Sijts, AJ.:** The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Letters.* 1999. 457. 333-338
- Zhang, Z., Krutchinsky, A., Endicott, S., Realini, C., Rechsteiner, M., Standing, KG.:** Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers. *Biochemistry.* 1999. 28. 5651-5658
- Zühl, F., Seemüller, E., Golbik, R., Baumeister, W.:** Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* 1997. 418. 189-94
- Zwickl, P., Grziwa, A., Pühler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F., Baumeister, W.:** Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the structure, function and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry.* 1992. 31. 964-72

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat	LMP	Low Molecular Weight Polypeptide
ATP	Adenosintriphosphat	MCP	Multicatalytic Protease
BSA	Bovine Serum Albumin	MHC	Major Histocompatibility Complex
Bz-VGR-MCA	Benzoyl-Valyl-Glycyl-Arginyl-4-methyl-7-cumarylamid	NEpHGE	Non-Equilibrium pH Gradient Gel Electrophoresis
CAPS	Cyclohexylaminopropane Sulfonic Acid	PA28	Proteasomaktivator 28
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte	PA700	Proteasomaktivator 700
DEAE	Diethylaminoethyl	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	Phosphat Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol	PGPH	Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolysierend
ECL	Enhanced Chemiluminescence	PVDF	Polyvinylidendifluorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rpm	rounds per minute
ER	Endoplasmatisches Reticulum	RT	Raumtemperatur
FACS	Fluorescence activated cell sorter	SDS	Sodium Dodecylsulfat
FCS	Fetal Calf Serum	Suc-LLVY-MCA	Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-4-methyl-cumarinamid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	TAP	Transporter associated with Antigen Processing
FPLC	Fast Protein, Peptide and Polynucleotid Liquid Chromatography	TCA	Trichloressigsäure
GF	Gelfiltration	TEAD	Tris/EDTA/Azid/DTT
HLA	Human Leukocyte Antigen	TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
$\gamma$ IFN	$\gamma$ -Interferon	Tris	Tri-hydroxymethyl-aminomethan
IgG	Immunglobulin G	Z-GGL-MCA	Benzyloxycarbonyl-Glycyl-Glycyl-Leucyl-4-methyl-7-cumarinamid

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Biochemie der Charité' anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Dahlmann möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter der AG Kloetzel für die hilfreiche Unterstützung bei der Lösung zahlreicher Fragen und Probleme und für die sehr nette Arbeitsatmosphäre, besonders danke ich Annette Zoeger, Sybille Standera, Ilse Drung, Ulrike Kuckelkorn, Ulrike Seiffert, Michael Seeger. Bei Burkhardt Dahlmann, Annette Zoeger und Astrid Borchert bedanke ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Für die Glykananalytik möchte ich mich bei Detlef Grunow und Martin Zimmermann-Kordmann vom Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Charité' Campus Benjamin Franklin, bedanken.

Der KKGS-Stiftung Berlin danke ich für die Gewährung des Promotionsstipendiums.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Andreas für den wichtigen seelisch-moralischen Rückhalt und die große Unterstützung bei der „Brutpflege“ meiner Töchter.

## Lebenslauf

Nicola Klare (ehem. Messow)  
geboren am 25.07.1966 in Berlin

### **Schulbildung:**

**09/1973-08/1983** 10-klassige Oberschule in Berlin-Adlershof

**09/1987-07/1989** Abitur auf der Volkshochschule Berlin-Friedrichshain

### **Berufsausbildung:**

**09/1983-08/1986** Ausbildung zur Krankenschwester an der Medizinischen Fachschule Berlin-Buch

### **Berufstätigkeit:**

**09/1986-08/1989** Krankenschwester im KH Berlin Friedrichshain, Abt. Anästhesie und Intensivtherapie

### **Hochschulausbildung:**

**09/1989-08/1990** Studium der Chemie an der Technischen Universität Dresden

**09/1990-01/1997** Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin,

**05/1996-01/1997** Diplomarbeit im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, AG Prof. Dr. W. Reutter

### **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

**02/1997-12/1998** wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin, AG Prof. Dr. W. Reutter

**09/2000-09/2004** Promotion am Institut für Biochemie der Charité', AG Prof. Dr. P.-M. Kloetzel

### **Veröffentlichungen:**

**Messow, Nicola** (geb. Klare) (1997): Analyse der Glykosylierung von Membranglykoproteinen aus Leber und Morris Hepatom 7777 der Ratte. (Diplomarbeit, Freie Universität Berlin)

**Zoeger, A., Klare, N., Jungblut, P., Dahlmann, B. (2003):** 20S Proteasome Subtype patterns in different human cells. (Poster, 5th Workshop on proteasomes, Clermont-Ferrand, France)

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.  
Berlin, 19. Oktober 2004